Untersuchungen zur Auftrennung und Charakterisierung von Polysomen aus Warmblüter-Embryonen und über den Einfluß einiger embryotoxischer Pharmaka auf die Polysomenprofile

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
im Fachbereich Chemie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Izhak Dornacher

aus Tel–Aviv

1974

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546512_0014

Untersuchungen zur Auftrennung und Charakterisierung von Polysomen aus Warmblüter-Embryonen und über den Einfluß einiger embryotoxischer Pharmaka auf die Polysomenprofile

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
im Fachbereich Chemie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Izhak Dornacher

aus Tel–Aviv

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Referent: Prof. Dr. G. Koßmehl

Korreferent: Prof. Dr. W. Harrer

Korreferent: Prof. Dr. D. Neubert

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Juni 1974

Die vorliegende Arbeit wurde im
Pharmakologischen Institut der
Freien Universität Berlin
unter der Anleitung von
Prof. Dr. med. D. Neubert angefertigt.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	Einleitung	1
1.	Das Ribosom	1
1.1	Vorkommen und Struktur der Ribosomen	1
1.2	Die Polysomen	4
1.3	Struktur der Polysomen	6
2.	Methoden der Polysomenisolierung	9
2.1	Homogenisierung des zu untersuchenden Gewebes	9
2.2	Zusammensetzung der Homogenisierungsmedien	1o
2.3	Verwendung von RNAse-Inhibitoren	12
3.	Zur Theorie der Dichtegradientenzentrifugation	13
3.1	Die Svedberg-Gleichung	13
3.2	Das Sedimentationsverhalten einer Zone von Makromolekülen im Zentrifugalfeld	16
3.3	Die Form einer sedimentierenden Zone	22
4.	Technik der Dichtegradientenzentrifugation	23
4.1	Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation	23

		Seite
4.2	Lineare Gradienten	25
4.3	Exponentielle Gradienten	26
4.4	Der isokinetische Gradient	28
5.	Abhängigkeit des Polysomen-patterns vom Mengenverhältnis der mRNA zu den Ribosomen	31
II.	Problemstellung	33
III.	Methodik	36
1.	Substanzen	36
2.	Präparationsmedien	36
3.	Versuchstiere und Schwanger-schaftsdatierung	37
4.	Polysomenpräparation	38
5.	Gradientenzentrifugation und Erstellung von Polysomenprofilen	39
6.	Numerische Auswertung von Poly-somenprofilen durch einen Computer	41
7.	Graphische Darstellung der Computerauswertungen	46
IV.	Versuchsergebnisse und Diskussion	49
1.	Ermittlung geeigneter Zentri-fugationsbedingungen zur Er-stellung von Polysomenprofilen	49

		Seite
2.	Vergleich der Eigenschaften der Rotoren SW 41 Ti und SW 65 Ti bezüglich der Erstellung von Polysomenprofilen	5o
3.	Biologische und Methodische Meßwert-Schwankungen bei den durchgeführten Versuchen	53
3.1	Biologische Streuung bei Polysomenprofilen	55
3.2	Methodische Streuung bei Polysomenprofilen	61
4.	Einfluß von tRNA als RNA-Kompetitor auf Polysomenprofile	63
5.	Polysomenprofile von Rattenembryonen in den Tagen 12, 13, 14 und 15 der Gestation	72
5.1	Embryonale und fetale Entwicklung bei der Ratte	72
5.2	Vergleich der Polysomenprofile von Rattenembryonen in den Tagen 12, 13, 14 und 15 der Gestation	74
6.	Polysomenprofile von Mäuseembryonen in den Tagen 11, 12 und 13 der Gestation	79
6.1	Embryonale und fetale Entwicklung bei der Maus	79
6.2	Vergleich der Polysomenprofile von Mäuseembryonen der Tage 11, 12 und 13 der Gestation	79

		Seite
7.	Vergleich der Polysomenprofile von Mäuse- und Rattenembryonen analoger Entwicklungsstadien	33
8.	Vergleich der Polysomenprofile von Mäuseembryonen der Entwicklungstage 11, 12 und 13 mit den Polysomenprofilen der zugehörigen mütterlichen Lebern	37
8.1	Leber- und Embryogewebe als Untersuchungsmodell	37
8.2	Polysomenprofile aus Mäuselebern und -embryonen	38
9.	Hepatektomieversuche	96
9.1	Die Leber als regenerationsfähiges System	96
9.2	Einfluß der partiellen Hepatektomie auf die Polysomenprofile	97
1o.	Untersuchungen mit 6-Mercaptopurin	1o2
1o.1	Wirkungsmechanismus des 6-Mercaptopurins im Organismus	1o2
1o.2	Teratogene Eigenschaften des 6-Mercaptopurins	1o5
1o.3	Einfluß von 6-Mercaptopurin auf Polysomenprofile von Rattenembryonen am Tag 12 der Gestation	1o5
1o.3.1	Einwirkung von 2 x 25 mg/kg 6-MP im Abstand von 3 Stunden	1o7

		Seite
1o.3.2	Einwirkung von 5o mg/kg 6-MP für die Dauer von 1 1/2 Stunden	1o7
1o.3.3	Einwirkung von 5o mg/kg 6-MP für die Dauer von 3 Stunden	1o8
1o.3.4	Einwirkung von 5o mg/kg 6-MP für die Dauer von 6 Stunden	1o9
1o.3.5	Zusammenfassende Diskussion der 6-MP-Versuche	1o9
11.	Untersuchungen mit Cyclophosphamid (Endoxan^{R})	116
11.1	Wirkungsmechanismus des Endoxans im Organismus	116
11.2	Teratogene Eigenschaften des Endoxans	119
11.3	Einfluß von Cyclophosphamid auf Polysomenprofile von Rattenembryonen in den Tagen 12 und 14 der Gestation	119
11.3.1	Einwirkung von 1o mg/kg Endoxan am Tag 12 der Gestation für die Dauer von 1 1/2 Stunden	12o
11.3.2	Einwirkung von 1o mg/kg Endoxan am Tag 12 der Gestation für die Dauer von 3 Stunden	121
11.3.3	Einwirkung von 1o mg/kg Endoxan am Tag 14 der Gestation für die Dauer von 1 1/2 bzw. 3 Stunden	122

		Seite
12.	Untersuchungen mit D-Penicillamin	127
12.1	Chemische Eigenschaften und biologische Wirkung des D-Penicillamins	127
12.1.1	Chelatbildung	127
12.1.2	Depolymerisationseigenschaften	128
12.1.3	Thiazolidinring-Bildung	129
12.2	Möglichkeiten der Einwirkung von D-Penicillamin auf die Proteinbiosynthese und auf die Polysomenprofile	129
12.3	Einfluß von D-Penicillamin auf die Polysomenprofile behandelter Rattenembryonen	131
V.	Zusammenfassung	135
VI.	Literaturverzeichnis	139

I. EINLEITUNG

1. Das Ribosom

1.1 Vorkommen und Struktur der Ribosomen

Das Ribosom wurde mit Hilfe des Elektronenmikroskops von ROBINSON und BROWN (1953) und PALADE (1955) in Zellen entdeckt. Seine Bedeutung für den Prozeß der Proteinsynthese in der Säugetier-Leber wurde von LITTLEFIELD et al. 1955 gezeigt.

Beim Ribosom handelt es sich um eine Ribonucleoproteinpartikel, die bei Eukaryonten aus ca. 53 % RNA und 47 % Protein besteht, ein Molekulargewicht von ca. 4×10^6 Dalton besitzt, eine elyptische Form mit den Achsdimensionen 250 Å, 250 Å und 340 Å hat und einen Sedimentationskoeffizienten von 80 S aufweist.

Das Ribosom besteht aus zwei ungleich großen Untereinheiten, in die es unter bestimmten Bedingungen, wie z.B. bei Mg^{2+}-Entzug, zerfällt. Wird die Magnesiumionenkonzentration hinterher wieder auf mindestens 1 mM erhöht, rekombinieren die beiden Untereinheiten (auch Subunits genannt) wieder zum funktionsfähigen Ribosom. Die Subunits weisen eine Sedimentationskonstante von 40 S bzw. 60 S auf.

(Übersichtsartikel über das Ribosom siehe ARNSTEIN 1963 und PETERMAN 1964).

Ribosomen kommen vorwiegend im Cytoplasma der Zelle vor, wo sie entweder als Einzelpartikel (Monosomen) oder als Aggregate von zwei und mehr Ribosomen, die auf der mRNA aufgereiht sind, (Polysomen) vorliegen. In Zellen mit endoplasmatischem Reticulum sind die Ribosomen meist an diese Membranstrukturen gebunden; nur ein kleiner Teil kommt frei im Cytoplasma vor (PALADE und SIEKEVITZ 1956; BENEDETTI et al. 1966).

Diese beiden Klassen, freie und gebundene Polysomen, können getrennt isoliert werden (BLOBEL und POTTER 1967); die Hinweise mehren sich, daß diese beiden Klassen für die Synthese zweier verschiedener Proteinklassen verantwortlich sind: Die freien Ribosomen für die Synthese "stationärer" Proteine, die gebundenen Ribosomen für die Synthese "transportierbarer" Proteine.
Werden Ribosomen aus Warmblüterzellen durch Phenolextraktion deproteinisiert, läßt sich die ribosomale RNA (rRNA) isolieren, wobei drei verschiedene RNA-Komponenten der Sedimentationskoeffizienten 28 S, 18 S und 5 S erhalten werden. Die ribosomalen Proteine können in der zweidimensionalen Polyacrylamid-

Gelelektrophorese aufgetrennt werden (KALTSCHMIDT und WITTMANN 197o a, b). Dabei erhält man bei E. Coli aus der kleinen Untereinheit rund 32 verschiedene Proteine und aus der großen Untereinheit rund 39 verschiedene Proteine.

Außer im Cytoplasma wurden Ribosomen auch in den Mitochondrien der verschiedensten Spezies wie Neurospora, HeLa Zellen und Rattenleber entdeckt (KALF 1967; KÜNZEL und NOLL 1967; RIFKIN et al. 1967; ATTARDI und OJALA 1971; BREGA und VESCO 1971).
Man unterscheidet heute drei Klassen von Ribosomen nach ihren Sedimentationskoeffizienten:
Cytoplasmatische Ribosomen aus Tier-, Hefe- und Zellen höherer Pflanzen, die alle einen Wert von 8o S aufweisen, Ribosomen aus Mikroorganismen und Chloroplasten, die einen Wert von 7o S aufweisen, sowie tierische mitochondriale Ribosomen mit einer Sedimentationskonstante von nur 55 bis 6o S (O'BRIEN und KALF 1967; SWANSON und DAWID 197o; ATTARDI und OJALA 1971; BREGA und VESCO 1971), die somit entgegen früheren Ansichten und in Abweichung von den mitochondrialen Ribosomen aus Hefen kleiner als Bakterienribosomen sind.

1.2 Die Polysomen

Wie bereits erwähnt, kommen die Ribosomen häufig als Aggregate mehrerer Partikel vor, die auf einem mRNA-Strang aufgereiht sind und Polysomen genannt werden (RICH et al. 1963; NOLL et al. 1963).

Diese Polysomen bilden eine funktionelle Einheit in der Proteinbiosynthese.
Das Polysomenmodell stützt sich auf drei Beobachtungen:

1. auf elektronenmikroskopische Beobachtungen
2. auf die beobachtete Proportionalität zwischen der Polysomengröße und den Molekulargewichten der zugehörigen mRNA bzw. der synthetisierten Polypeptide (WETTSTEIN et al. 1964)
3. auf die Empfindlichkeit der Polysomen gegenüber kleinen Konzentrationen von Ribonucleasen.

Die Bedeutung der Polysomen für die Proteinsynthese wurde erstmals im Kaninchenreticulocyten-System demonstriert, als gezeigt werden konnte, daß entstehende Polypeptidketten, die in intakten Zellen radioaktiv markiert wurden, im Saccharosegradienten nicht im Bereich der 8o S Ribosomen, sondern im Bereich der schwereren Aggregate vorhanden waren (WARNER et al. 1962; GIERER 1963). Diese Aggregate erschienen im Elektronenmikro-

skop als Konglomerate aus 4 - 6 Ribosomen (SLAYTER et al. 1963) mit einer Länge von ca. 1500 Å.
Dies schien in guter Übereinstimmung mit der erwarteten Länge der Globin-mRNA, wenn man davon ausging, daß:

1. die Polysomen eine mRNA für die Synthese einer einzelnen Globinkette aus ca. 150 Aminosäuren besitzen
2. je drei Nucleotide für eine Aminosäure codieren (Triplett Code)
3. die daraus resultierenden 450 Nucleotide einen Abstand von 3,4 Å voneinander haben, wie es der Fall in der DNA ist (FULLER und HODGSON 1967).

Zur gleichen Zeit stellten STAEHELIN et al. (1964) eine Beziehung zwischen der Polysomengröße und der Länge der ihnen zugehörigen mRNA auf.
Eine Ausnahme im oben beschriebenen Schema des Polysomenmodells sollte nicht unerwähnt bleiben. Es konnte gezeigt werden, daß Monosomen aus Kaninchenrettculocyten (LAMFROM und KNOPF 1965), wie auch aus Rattenleber (MUNRO et al. 1964) in der Lage sind, vollständige, neue Polypeptidketten in einem zellfreien System zu synthetisieren. Daraus läßt sich folgern, daß Polysomen für die Proteinsynthese zwar nicht obligatorisch, wohl aber ökonomisch sind.

1.3 Struktur der Polysomen

Werden Polysomen der Einwirkung sehr geringer Mengen Ribonucleasen ausgesetzt (z.B. o,o3 µg RNAse pro mg RNA), so werden sie schnell zu Monosomen degradiert, wobei deren Proteinsynthesekapazität merklich abnimmt (ARNSTEIN 1961).
Daher rührt die größte Gefahr für die Integrität der Polysomen während deren Isolierung von den cytoplasmatischen RNAsen her, die während der Zellfraktionierung aus den Kernen oder Lysosomen freigesetzt werden können und dann entweder sofort wirksam werden, oder erst an die Ribosomen angelagert werden, um später unter geeigneten ionischen Bedingungen zu reagieren.
Polysomen aus Ratten-Lymphknoten (MANNER und GOULD 1965), Kaninchen-Reticulocyten (ZAK et al. 1966), Rattenleber (NAIR et al. 1966) sowie aus Seeigel-Eiern (PIATIGORSKY 1968) können auch durch proteolytische Enzyme (z.B. Trypsin, Chymotrypsin, Papain) degradiert werden.
Dies ist nicht weiter verwunderlich, wenn man folgende Tatsachen berücksichtigt:
Erstens deuten elektronenoptische Studien der Polysomenstruktur darauf hin, daß kleine Polysomen aus Rosetten von ca. 5 - 6 Ribosomen bestehen, die eng zusammengepackt sind, wobei die kleinen

Subunits einen Kreis bilden; größere Polysomen bilden eine Helix mit einer Schraubung von ca. 6 Ribosomen, wobei wiederum die kleinen Subunits nach innen zeigen (STAEHELIN und KUFF 1966).
Schon vorher wurde die helicale Struktur der Polysomen von PFUDERER et al. (1965) auf Grund hydrodynamischer Studien der Polysomen vorgeschlagen. Diesem Modell entsprechend beruht also die Erhaltung der Polysomenstruktur nicht nur auf der Integrität der mRNA allein, sondern auch auf einer Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen den kleinen Subunits. Es ist daher leicht zu erklären, weshalb proteolytische Enzyme die Integrität der Polysomen negativ beeinflussen.
Zweitens wird heute angenommen, daß die mRNA aus dem Kern in das Cytoplasma als Ribonucleopartikel transportiert wird und auch im Polysom als m-Ribonucleoproteinkomplex existiert (SPOHR et al. 197o), aus dem sie durch EDTA-Behandlung freigesetzt werden kann (HUEZ et al. 1967; PERRY und KELLY 1968).
Die Bedeutung dieser messenger-gebundenen Proteine ist zwar noch nicht völlig geklärt, es ist jedoch einzusehen, daß deren Zerstörung durch proteolytische Enzyme die Integrität der Polysomenstruktur zunichte machen kann. Die Degradation von Polysomen ist jedoch nicht

nur aus der zufälligen Fragmentierung der mRNA durch Scherkräfte oder RNAsen zu erklären. Sie erfolgt auch geregelt, infolge der geregelten Freisetzung eines einzelnen Ribosoms vom Ende einer intakten mRNA (HARDESTY et al. 1963). Dies wird unter meist reversiblen Stoffwechselbedingungen beobachtet, in denen die Initiation neuer Peptidketten im Verhältnis zur Kettentermination behindert ist. So beobachtet man z.B. beim starken Abkühlen intakter Zellen eine massive Polysomen-Degradation, vermutlich weil die Ketteninitiation eine wesentlich höhere Aktivierungsenergie benötigt als die Kettenelongation (DAS und GOLDSTEIN 1968; FRIEDMAN et al. 1969). Entsprechend verwandeln Inhibitoren der Energiegewinnungsprozesse, wie z.B. Dinitrophenol, ebenfalls Polysomen zu Monosomen, vermutlich auch durch Inhibition der energieverbrauchenden Initiationsschritte. Inhibitoren der Proteinsynthese, wie z.B. NaF (MARKS et al. 1965; VESCO und COLOMBO 197o) oder Aurintricarbonsäure (LEBLEU et al. 197o) degradieren ebenfalls Polysomen zu Monosomen, indem bestimmte Schritte im Initiationsvorgang blockiert werden.

2. Methoden der Polysomenisolierung

2.1 Homogenisierung des zu untersuchenden Gewebes

Polysomen und Ribosomen können aus verschiedenen tierischen Zellen gewonnen werden.
Dabei müssen stets einige Grundbedingungen eingehalten werden:

1. passende Vorrichtungen zum Aufbrechen der Zellmembranen
2. schnelle Aufarbeitung
3. Unterhaltung niedriger Temperaturen (o - 4° C) während der gesamten Aufarbeitungsdauer.

Einige Zellsorten, wie z.B. Reticulocyten, können durch osmotischen Schock lysiert werden; normalerweise werden jedoch mechanische Vorrichtungen, wie z.B. Potter-Elvehjem-Glashomogenisatoren, verwendet. Homogenisiert wird meistens in einem saccharosehaltigen Medium (o,15 - o,45 M). Meist wird eine isotonische Lösung (o,25 M) verwendet, um die Zerstörung von Mitochondrien und Lysosomen zu verhindern. Ist das Gewebe, aus dem die Polysomen isoliert werden sollen, besonders fest oder faserig (z.B. Herzmuskelgewebe), muß vor dem Homogenisieren kurz mit Proteinase behandelt werden, um das Aufbrechen der zellulären Strukturen zu erleichtern (EARL und

KORNER 1965). Zur Isolierung von Polysomen aus Skelettmuskel wurde der Virtis 45 Sonificator benutzt (FLORINI und BREUER 1966). Dabei ist jedoch größte Vorsicht geboten, da Ultraschall leicht auch die Polysomenstruktur zerstört (WILLIAMSON et al. 1969; ZYLBER und PENMAN 197o).
Bei manchen Zelltypen hat sich die Verwendung von Detergentien als gutes Hilfsmittel erwiesen. So wurde z.B. DOC (Deoxycholat) oder Brij-58 bei HeLa-Zellen verwendet (HUANG und BALTIMORE 1969), während bei Nierenzellen sich Nonident P-4o als sehr wirkungsvoll erwiesen hat (ASCIONE und ARLINGHAUS 197o).

2.2 Zusammensetzung der Homogenisationsmedien

Die Zusammensetzung der verwendeten Homogenisationsmedien ist bei den einzelnen Autoren recht verschieden.
Im allgemeinen wird eine wässrige Saccharoselösung verwendet (o,15 - o,45 M), meist eine isotonische Lösung (o,45 M), bei deren Verwendung eine Zerstörung der Mitochondrien und Lysosomen verhindert wird. Ferner enthält das Medium zwischen 3 und 2o mM K^+ und 1 bis 15 mM Mg^{2+} pro Liter. Wird diese Magnesiumkonzentration wesentlich unterschritten, so zerfallen die Ribosomen in ihre

Untereinheiten, während zu hohe Konzentrationen zu unspezifischen Aggregaten führen. Neben K^+ werden manchmal auch NH_4^+-Ionen verwendet, deren Effekt jedoch umstritten ist. Das Homogenisationsmedium enthält ferner einen Puffer, um pH-Schwankungen während der Präparation abzufangen. Häufig wird das System Tris (Tris-hydroxymethyl-aminomethan)/HCI verwendet. In letzter Zeit werden jedoch andere Puffersysteme verwendet, die dem Tris überlegen sind, da deren Pufferkapazität weniger temperaturabhängig ist. Besonders bewährt hat sich TES (Tris-(hydroxymethyl)-methyl-2-aminoäthansulfonsäure). Obwohl Polysomen über einen recht breiten pH-Bereich stabil sind (pH 6,o - 8,8), verwendet man bei deren Isolierung meist einen pH-Wert um 7,8, da sie bei diesem pH-Wert eine optimale Proteinsyntheseaktivität zeigen. Da der größte Teil der Ribosomen in der eukaryontischen Zelle an Membranstrukturen (endoplasmatisches Reticulum) gebunden ist, hat sich die Verwendung von Detergentien wie Deoxycholat (DOC) und Natriumdodecylsulfat (ionische Detergentien) oder Triton X-1oo, Lubrol W und Isooctan (nichtionische Detergentien) als zweckmäßig erwiesen. Während zu Anfang z.B. DOC zu den bereits isolierten Mikrosomen zugesetzt wurde (LITTLEFIELD et al. 1955),

hat es sich später als günstiger erwiesen, das Detergens zum postmitochondrialen Überstand zuzusetzen. So können die im Überstand befindlichen RNAse-Hemmer die durch das Detergens freigesetzten RNAsen neutralisieren (WETTSTEIN et al. 1963).
Bei Rattenlebern hat sich Triton X-1oo in ca. 1 %iger Konzentration dem DOC als überlegen erwiesen (HUNTER und KORNER 1966). Es scheint so, als würde DOC bestimmte, mit der mRNA assoziierte Proteine entfernen, wodurch die mRNA leichter durch RNAsen angreifbar wird; Triton X-1oo dagegen entfernt diese Proteine nicht (OLSNES 197o).

2.3 Verwendung von RNAse-Inhibitoren

Da RNAsen die größte Gefahr für die Integrität der Polysomenstruktur darstellen, wird versucht, deren Angriff entgegenzuwirken, indem man die Aufarbeitungszeit möglichst kurz hält, in der Kälte arbeitet und die Zerstörung subzellulärer, RNAse-haltiger Partikel, wie z.B. Lysosomen, möglichst vermeidet. Als vierte Möglichkeit bietet sich die Verwendung von RNAse-Hemmern an.
Die essigsaure Tonerde Bentonit (MURTHY und RAPPOPORT 1965), besonders wenn sie nach einer ganz bestimmten Vorschrift zubereitet wird (WATTS und MATHIAS 1967),

kann als solcher Inhibitor verwendet werden. Auch Macaloid, ebenfalls eine essigsaure Tonerde (WILLIAMSON und ASKONA 1967), Dextransulfat (ASCIONE und ARLINGHAUS 197o), Heparin (ROWLEY und MORRIS 1966) und niedermolekulare, lösliche RNA (LA VIA et al. 1967; GERLINGER et al. 1973) werden häufig für diese Aufgabe verwendet. Auch native RNAse-Inhibitoren sind mittlerweile bekannt. So isolierten ROTH (1958), BLOBEL und POTTER (1966), LAWFORD et al. (1966) und SUGANO et al. (1967) aus der Rattenleber einen cytoplasmatischen RNAse-Inhibitor, während TAKAHASHI et al. (1966) einen solchen aus dem Zellsaft des cerebralen Cortex isolierten.

3. Zur Theorie der Dichtegradientenzentrifugation

3.1 Die Svedberg Gleichung

In einem gegebenen Zentrifugalfeld greifen an einem sich in Lösung befindlichen Molekül des Volumens V und der Dichte folgende drei Kräfte an:

Zentrifugalkraft $K_1 = \omega^2 \times v\rho'$

Auftriebskraft $K_2 = \omega^2 \times v\rho$

Reibungskraft $K_3 = S \cdot f$

Dabei bedeuten:

- x=Abstand vom Rotationszentrum
- ω-Winkelgeschwindigkeit des Rotors
- ρ=Dichte des Mediums
- f=Reibungsfaktor = $6 \pi \eta r$ (Stokes)
- S=Sedimentationsgeschwindigkeit

Im Kräftegleichgewicht gilt die Beziehung:

$$K_1 = K_2 + K_3 \quad \text{oder}$$

$$K_3 = K_1 - K_2 \quad \text{daraus folgt:}$$

$$S \cdot f = \omega^2 x V \rho' - \omega^2 x V \rho \quad \text{oder}$$

$$S = \omega^2 x \frac{V(\rho' - \rho)}{f} \qquad (1)$$

Wenn ω, x und ρ gegeben sind, hängt also die Sedimentationsgeschwindigkeit des Moleküls nur noch von dessen Eigenschaften wie Volumen, Dichte und Form ab.

Nach SVEDBERG und PEDERSEN (1940) wird die Sedimentationsgeschwindigkeit, bezogen auf die Zentrifugalbeschleunigung, als Sedimentationskonstante s bezeichnet:

$$s = \frac{S}{\omega^2 x} = \frac{V(\rho' - \rho)}{f} \qquad (2)$$

Diese stellt eine vom Zentrifugalfeld unabhängige, charakteristische Stoffkonstante dar, die die Gesamtheit der Partikeleigenschaften einschließt. Allerdings hängt der Wert von s noch von der Zusammensetzung des Zentrifugationsmediums, dessen Temperatur und der Partikelkonzentration ab. Dadurch wird der Vergleich von s-Werten, die zwar im gleichen Zentrifugalfeld, jedoch unter verschiedenen Bedingungen ermittelt wurden, erschwert. Es hat sich daher als zweckmäßig erwiesen, die s-Werte auf Standardbedingungen zu normieren:
Lösungsmittel sei reines Wasser,
die Temperatur sei 20° C,
die Partikelkonzentration wird auf unendliche Verdünnung extrapoliert.
Man erhält dann:

$$s_{20,w} = s \frac{\eta \, (1-\bar{v}\rho)_{20,w}}{\eta_{20,w} \, (1-\bar{v}\rho)} \qquad (3)$$

wobei η bzw. $\eta_{20,w}$ die Viskosität des Lösungsmittels bei gegebener Temperatur bzw. des Wassers bei 20° C sind, und ρ bzw. $\rho_{20,w}$ sind die Dichten des Mediums bei gegebener Temperatur bzw. des Wassers bei 20° C. $\bar{v}$ ist das partielle spezifische Volumen der Partikel.
Vergleicht man nun Partikel verschiedener $s_{20,w}$-Werte, so bedeutet ein großer Wert, daß die Partikel im Zentrifugalfeld

schnell sedimentiert, während ein kleiner Wert eine langsame Sedimentation bedeutet.

Setzt man in Gleichung (2) nach der Einsteinschen Gleichung $f = \frac{RT}{DN}$ und $\rho = \frac{1}{\bar{V}}$ ein, so erhält man durch Substitution Gleichung (4):

$$S = \frac{MD\,(1-\bar{V}\rho)}{RT} \qquad (4) \quad \text{bzw.}$$

$$M = \frac{RTS}{D(1-\bar{V}\rho)} \qquad (5)$$

Gleichung (5) ist die bekannte Svedberg-Gleichung, aus der bei entsprechender Kenntnis der anderen Größen wichtige molekulare Größen wie Molekulargewicht, partielles Volumen oder Diffusionskonstante berechnet werden können.
In dieser Gleichung bedeuten:

R = allgemeine Gaskonstante
T = Temperatur
D = Diffusionskonstante
N = Avogadro-Zahl

3.2 Das Sedimentationsverhalten einer Zone von Makromolekülen im Zentrifugalfeld

Betrachtet man das Sedimentationsverhalten einer Zone von Makromolekülen im Zentrifugalfeld in einem zylindrischen Röhrchen, unter vorläufiger Vernachlässigung von Dichte- und Viskositäts-

gradienten, und unter der Annahme einer einzelnen Molekülsorte in der Lösung, so gilt für den Transportprozeß der Massen durch eine senkrecht zur Sedimentationsrichtung stehenden Ebene:

$$\left(\frac{\partial m}{\partial t}\right)_{r}^{durch} = A c \left(\omega^2 s r\right) - A D \left(\frac{\partial c}{\partial r}\right)_t \qquad (6)$$

darin bedeuten:

- $\left(\frac{\partial m}{\partial t}\right)$ = Massendurchflußrate
- r = im Röhrchen zurückgelegte Strecke
- A = Durchtrittsfläche
- C = Konzentration an der Durchtrittsfläche
- D = Diffusionskoeffizient
- $\left(\frac{\partial c}{\partial r}\right)$ = Konzentrationsgefälle an der Durchtrittsfläche
- t = Zeitpunkt der Betrachtung

Die Durchflußrate durch die Fläche hindurch ist gleich der Abnahme der Masse oberhalb der Durchtrittsfläche:

$$\left(\frac{\partial m}{\partial t}\right)_{r}^{durch} = - \left(\frac{\partial m}{\partial t}\right)_{r}^{oberhalb} \qquad (7)$$

daraus folgt

$$\left(\frac{\partial m}{\partial t}\right)_{r}^{oberhalb} = A C \left(\omega^2 s r\right) - A D \left(\frac{\partial c}{\partial r}\right)_t \qquad (8)$$

Von jetzt an wird der Index "oberhalb r" wegfallen, gilt jedoch weiter.
Gleichung (8) wird vom Meniskus (a) zum Boden des Röhrchens (b) integriert. Da die Integrationskonstante zeitunabhängig ist, können die Zeit-Differentialquotienten außerhalb des Integrals gezogen werden:

$$-\frac{\partial}{\partial t}\int_a^b m\,d\tau = \omega^2 s\int_a^b \tau\,(AC\,d\tau) - DA\int_a^b \left(\frac{\partial c}{\partial \tau}\right) d\tau \qquad (9)$$

Da während der Zentrifugation die Zone (a) verlassen und die Zone (b) noch nicht erreicht wurde, sind beide Werte gleich Null.
Ferner gilt für die Masse in einer Zone der Dichte dr:

$$dm = Ac\,d\tau$$

Daraus folgt:

$$-\frac{\partial}{\partial t}\int_a^b m\,d\tau = \omega^2 s\int_a^b \tau\,dm \qquad (10)$$

Durch partielle Integration erhält man:

$$\frac{\partial}{\partial t}\int_a^b m\,d\tau = \frac{\partial}{\partial t}\left[mb\cdot b - ma\cdot a - \int_a^b \tau\,dm\right] \qquad (11)$$

da jedoch ($m_b \cdot b - m_a \cdot a$) konstant ist, gilt beim Einsetzen der Gleichung (11) in Gleichung (1o):

$$\frac{\partial}{\partial t}\int_a^b r\,dm = \omega^2 s \int_a^b r\,dm \qquad (12)$$

Der Einfachheit halber soll von nun an geschrieben werden:

$$\langle r \rangle \equiv \frac{\int_a^b r\,dm}{\int_a^b dm} \qquad (13)$$

Da dm der gesamten Masse im Zentrifugenröhrchen entspricht und daher zeitunabhängig ist, kann Gleichung (12) durch diesen Term dividiert werden, so daß man erhält:

$$\frac{d\langle r \rangle}{dt} = \omega^2 s \langle r \rangle \quad \text{bzw.} \quad \frac{d \ln \langle r \rangle}{dt} = \omega^2 s \qquad (14)$$

Gleichung (14) hat nun folgende Aussage: In einem Röhrchen von einheitlichem Querschnitt ist die Sedimentationsgeschwindigkeit des Schwerpunktes einer sedimentierenden Zone gleich der Sedimentationsgeschwindigkeit der einzelnen Moleküle dieser Zone.
Sind nun mehrere, miteinander nicht reagierende Molekülsorten verschiedener Sedimentationskonstanten in einer Initial-

zone vorhanden, so kann Gleichung (12) unabhängig für jede Molekülsorte geschrieben werden:

$$\frac{\partial}{\partial t}\int_a^b r\,d\sum_i m_i = \sum_i(\omega^2 s)(\langle r\rangle_i)\int_a^b dm_i \equiv \langle r\rangle\sum_i\int_a^b dm_i \quad (15)$$

$\langle v\rangle$ entspricht dem gewichteten Durchschnitt der Sedimentationsgeschwindigkeit der aufgeschichteten Zone bei Zentrifugationsbeginn.
Geht man nun einen Schritt weiter und betrachtet einen Dichtegradienten, der ja auch gleichzeitig einen Viskositätsgradienten darstellt, so gilt:

$$S = S_{20,w}\,\frac{(1-\bar{v}\rho)}{(1-\bar{v}\rho)_{20,w}}\cdot\frac{\eta_{20,w}}{\eta} \quad (16)$$

und

$$D = D_{20,w}\,\frac{\eta_{20,w}}{\eta} \quad (17)$$

daraus folgt:

$$-\int_a^b\frac{\partial m}{\partial t}dr = S_{20,w}\int_a^b\frac{(1-\bar{v}\rho)}{(1-\bar{v}\rho_{20,w})}\cdot\frac{\eta_{20,w}}{\eta}\cdot r\,A\,c\,dr - D_{20,w}\,\eta_{20,w}\,A\int_a^b\frac{1}{\eta}\left(\frac{\partial c}{\partial r}\right)_t dr \quad (18)$$

Partielle Integration von $A\int_a^c \frac{1}{\eta}\left(\frac{\partial c}{\partial \tau}\right)_t d\tau$ führt zu:

$$A\int_a^b \frac{1}{\eta}\left(\frac{\partial c}{\partial \tau}\right)_t d\tau = -A\int_a^b \left(\frac{\partial (c/\eta)}{\partial \tau}\right)_t d\tau + A\int_a^b \frac{1}{\eta^2}\left(\frac{\partial \eta}{\partial \tau}\right)_t dc\,d\tau \quad (19)$$

Da $A\int_a^b \left(\frac{\partial (c/\eta)}{\partial \tau}\right)_t d\tau$ ein vollständiges Integral ist und somit in den Grenzen (a) und (b) gleich Null ist, ergibt sich aus Gleichung (18):

$$-\int_a^b \frac{\partial m}{\partial t}\,d\tau = S_{20,w}\int_a^b \frac{(1-\bar{v}\rho)}{(1-\bar{v}\rho_{20,w})}\cdot\frac{\eta_{20,w}}{\eta}\,dm - D_{20,w}\eta_{20,w}\int_a^b \frac{1}{\eta^2}\left(\frac{\partial \eta}{\partial \tau}\right)_t dm \quad (20)$$

wobei $A\,dc\,d\tau = dm$ ist.

$-\int_a^b \frac{\partial m}{\partial t}\,d\tau$ entspricht $d(\int r\,dm)/dt$. Wird durch $\int dm$ dividiert, und werden die spitzen Klammern wieder verwendet, um gewichtete Mittelwerte darzustellen, wird Gleichung (2o) umgeformt zu:

$$\frac{d\langle\tau\rangle}{dt} = \omega^2 S_{20,w}\left\langle\tau\frac{(1-\bar{v}\rho)}{(1-\bar{v}\rho_{20,w})}\cdot\frac{\eta_{20,w}}{\eta}\right\rangle + D_{20,w}\eta_{20,w}\left\langle\left(\frac{\partial \eta^{-1}}{\partial \tau}\right)_t\right\rangle \quad (21)$$

Gleichung (21) ist exakt und ohne jegliche Näherungsannahme. Die Anwesenheit eines Gradienten bewirkt also einen unsymmetrischen diffusiven Massentransport.

Die Vorderkante der sedimentierenden Zone verläuft steiler (geringere Diffusion)

als die Rückseite der Zone (band sharpening).
Werden die gewichteten Mittelwerte der rechten Seite der Gleichung (21) durch ihre korrespondierenden Größen im Zentrum der Sedimentation substituiert, kann Gleichung (21) bezüglich der Zeit integriert werden:

$$\int_{a}^{b} \frac{\left[\frac{1-\bar{\nu}\rho}{1-\bar{\nu}\rho_{20,w}} \frac{\eta_{20,w}}{\eta}\right]_c \cdot d\ln\langle r\rangle}{\left[1-\frac{RT(d\ln\eta/dr)_c}{\omega^2\langle r\rangle M(1-\bar{\nu})_c}\right]} \equiv \omega^2 s_{20,w}(t-t_0) \quad (22)$$

$\ln\langle r_0\rangle$

3.3 Die Form einer sedimentierenden Zone im Zentrifugalfeld

Das Problem der Form sedimentierender Zonen im Zentrifugalfeld wurde von GEHATIA und KATCHALSKI (1959) in folgender Form gelöst:
Die Initialzone sei unendlich dünn, die Wechselwirkung der Moleküle mit dem Medium sei ebenso vernachlässigbar wie die intramolekulare Wechselwirkung, die Einflüsse von Dichte- und Viskositätsgradienten werden vernachlässigt. Unter diesen idealisierten Bedingungen gilt dann:

$$c(r,t) = \frac{c(r,0)}{2(\pi D\omega^2 t)^{1/2}} \exp\left[-\frac{(\langle r\rangle - r)^2}{4D\omega^2 t}\right] \quad (23)$$

wobei $\alpha = (\exp[2\omega^2 st] - 1)4\omega^2 st$ und σ_0 die Breite der Initialzone sind.
Diese Gleichung entspricht der Gaußschen Funktion:

$$y = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \exp - \frac{(x - x_0)^2}{2\sigma^2}$$

Wir bereits erwähnt, bewirkt die Anwesenheit eines Dichte- und Viskositätsgradienten einen unsymmetrischen diffusiven Massentransport. Dadurch weicht der Verlauf der die Form der sedimentierenden Zone beschreibenden Funktion von der Gaußschen Form ab (band sharpening). Zur Übersicht und Diskussion der hier behandelten Theorie siehe SCHUMAKER (1967) und DE DUVE (1959).

4. Technik der Dichtegradientenzentrifugaion

4.1 Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation

Die Dichtegradientenzentrifugation (auch Differentialzonenzentrifugation genannt) dient dazu, ein Gemisch von Molekülen, die sich in ihren Eigenschaften wie Molekulargewicht, Dichte, partielles Volumen und Form unterscheiden, in seine Komponenten zu trennen.
Da mit steigendem Molekulargewicht das Verhältnis von Molekülоberfläche zu Molekülmasse kleiner wird, und damit auch die relativen Reibungs- und Auftriebskräfte abnehmen, steigt die Sedimentationsge-

schwindigkeit mit dem Molekulargewicht, wenn Moleküle mit ähnlicher Form und ähnlichem Volumen betrachtet werden. Wird daher eine Flüssigkeit, die die zu trennenden Moleküle enthält, in schmaler Zone über einen Dichtegradienten geschichtet und einem Zentrifugalfeld ausgesetzt, so werden sich die Moleküle aufgrund ihrer verschiedenen Sedimentationskonstanten in getrennten Zonen anreichern. Der Gradient, der einen positiven Konzentrationsverlauf aufweist, erfüllt drei Funktionen:
Zum einen trägt er die aufgegebene Teilchenschicht und verhindert deren frühzeitiges Absinken, zum anderen wirkt er der Konvektion entgegen, und schließlich begünstigt er die Trennung der verschiedenen Molekülsorten.
Daraus ergibt sich, daß der Konzentrationsverlauf eines Gradienten einen entscheidenden Einfluß auf dessen Trennvermögen hat.
Man unterscheidet prinzipiell zwei Arten von Gradienten:

1. die linearen Gradienten
2. die gekrümmten, meist exponentiellen, Gradienten.

Beide Arten entstehen grundsätzlich nach dem gleichen Prinzip der Zugabe einer Saccharoselösung der Konzentration C_r aus einem Reservoir zu einer Saccharoselösung der Konzentration C_v in einer Misch-

kammer, während aus der letzteren kontinuierlich die resultierende Mischung in ein Gradientenröhrchen überführt wird. Die Anfangskonzentration in der Mischkammer ändert sich als Funktion des zugesetzten Volumens und nähert sich sukzessiv der Konzentration im Reservoir ($C_v \longrightarrow C_r$).

4.2 Lineare Gradienten

werden in zwei kommunizierenden Gefäßen mit Rührern geformt, in die zwei verschieden konzentrierte Saccharoselösungen gegeben werden (BRITTEN und ROBERTS 1960). Durch das kommunizierende Prinzip fließt aus dem Reservoir ebensoviel Lösung in die Mischkammer, wie aus dieser in die Gradientenröhrchen abfließt.
Dabei nimmt das Volumen in beiden Kammern gleichermaßen ab. Dabei gilt:

$$\frac{dC_v}{dV} = \frac{C_r - C_v}{V_m} \qquad (24)$$

dV entspricht dem aus dem Reservoir zugeflossenen Volumen. V_m entspricht dem Volumen in der Mischkammer.
Da $dV = -dV_m$ ist, gilt nach Integration:

$$\ln |C_v - C_r| + K = \ln V_m \qquad (25)$$

Die Anfangsbedingungen waren $V_m = V_a$ und $C_v = C_a$ (a = Anfang), daraus folgt:

$$K = \ln \frac{V_a}{|C_a - C_r|}$$

und daraus wiederum folgt:

$$\ln |C_v - C_r| + \ln \frac{V_a}{C_a - C_r} = \ln V_m \qquad (26)$$

Gleichung (26), nach C_v aufgelöst, ergibt:

$$C_v = C_r + (C_a - C_r)(V_m / V_a) \qquad (27)$$

Diese Gleichung drückt den Konzentrationsverlauf im Gradienten, bezogen auf das in der Mischkammer befindliche Volumen, aus.
Soll der Konzentrationsverlauf des Gradienten als Funktion des Gradientenvolumens ausgedrückt werden, so ergibt sich:

$$C_v = \frac{C_r - C_a}{2V_a} V + C_a \qquad (28)$$

4.3 Exponentielle Gradienten

Wird im Unterschied zur Darstellung eines linearen Gradienten das Volumen in der Mischkammer konstant gehalten, erhält man einen exponentiellen Verlauf des Gradienten. Die allgemeine Form der Differentialgleichung zur Beschreibung eines solchen

Gradienten gleicht Gleichung (24). Die integrierte Form jedoch ist eine andere, da das Volumen in der Mischkammer konstant gehalten wird:

$$\ln |C_v - C_r| + K = -V/V_m \qquad (29)$$

Gleichung (29) beschreibt die Konzentration in der Mischkammer als Funktion des zugesetzten Volumens, bzw., da V_m=konst. ist, als Funktion des im Gradienten akkumulierenden Volumens.
Da die Randbedingungen V=o und $C_v=C_r$ gelten, folgt aus (29):

$$K = -\ln |C_a - C_r| \qquad (30)$$

Wird dieser Wert für K in Gleichung (29) eingesetzt, so erhält man:

$$\ln \left| \frac{C_v - C_r}{C_a - C_r} \right| = \frac{V}{V_m} \quad \nearrow \quad (C_v - C_r)/(C_a - C_r) = e^{-V/V_m}$$

und daraus folgt:

$$C_v = C_r + (C_a - C_r) e^{-V/V_m} \qquad (31)$$

Je nachdem, ob die Konzentration der Saccharoselösung in der Mischkammer grösser oder kleiner als im Reservoir ist, erhält man konkav- bzw. konvex-exponentielle Gradienten.

4.4 Der isokinetische Gradient

Ein Spezialfall des konvex-exponentiellen Gradienten ist der von NOLL (1967) entwickelte isokinetische Gradient. Da die Viskosität der Saccharoselösung im Gradienten normalerweise mit steigender Entfernung vom Rotationszentrum schneller ansteigt als die Zentrifugalkraft, verlangsamt sich die Sedimentationsbewegung der Moleküle während des Zentrifugationsvorganges, was für die Auflösung im unteren Teil des Gradienten von Nachteil ist. Um diese Schwierigkeit zu beseitigen, sollte die Viskosität der Lösung möglichst so ansteigen, daß die Moleküle mit konstanter Geschwindigkeit sedimentieren können. Für eine gegebene Temperatur ist die Sedimentationsgeschwindigkeit eines Teilchens der Dichte ρ_p durch ein Medium der Dichte ρ_m und der Viskosität η_m im Zentrifugalfeld $\omega^2 r$ gleich:

$$dr/dt = s_{20,w}(\omega^2/A)(\rho_p - \rho_m)r/\eta_m \quad (32)$$

Der Term $A = (\rho_p - \rho_m)/\eta_{20,w}$ wird hier eingeführt, um die Messung bezüglich der Temperatur und der Viskosität von Wasser bei 20°C zu normieren und ist für jeden gegebenen ρ_p-Wert konstant.
Aus (32) kann die Gleichung für den isokinetischen Gradienten abgeleitet werden, indem gefordert wird, daß der zweite Term

der Gleichung (32) $(\rho - \rho_m)r/\eta_m$ konstant gehalten wird.
Werden die Anfangsbedingungen durch den Abstand r_t des Meniskus vom Rotationszentrum, durch die Wahl der Saccharosekonzentration am Meniskus C_t und durch die resultierenden Werte für ρ_t und η_t gegeben, so ergibt sich aus der Bedingung der konstanten Sedimentationsgeschwindigkeit, daß an jeder Stelle im Gradienten gilt:

$$\eta_m(r)/\eta_t = r\left[\rho_F - \rho_m(r)\right] \Big/ r_t(\rho_F - \rho_t) \qquad (33)$$

Werden in dieser Gleichung die Funktionen $\eta(c)$ und $\rho(c)$, die die Abhängigkeit der Viskosität und der Dichte von der Saccharosekonzentration angeben, eingesetzt, erhält man die Gleichung für den isokinetischen Gradienten:

$$\eta(c) = \frac{\eta_t}{r_t(\rho_F - \rho_t)}\, r\left[\rho_F - \rho(c)\right] \qquad (34)$$

Näherungsweise gilt für die Funktionen $\eta(c)$ und $\rho(c)$:

$$\eta(c) = \exp\left(\alpha \frac{c}{100 - c} + \beta c^2 + \gamma\right) \qquad (35)$$

und

$$\rho(c) = \mu\,(c - c_t) + \rho_t \qquad (36)$$

Hierbei sind:

α und β temperaturabhängige Konstanten

C die Saccharosekonzentration in % (w/w)

γ der natürliche Log der Viskosität des Wassers bei T°C

μ eine Konstante

Werden Gleichung (35) und (36) in Gleichung (34) eingesetzt, erhält man die Gleichung für den Konzentrationsverlauf des isokinetischen Gradienten:

$$\exp\left(\alpha \cdot \frac{C}{100 - C} + \beta C^2 + \gamma\right) = \frac{\eta_t}{r_t^2\,(\rho_p - \rho_t)}\,\tau\left[\rho_p - \mu\,(C - c_t) - \rho_t\right] \qquad (37)$$

Diese Gleichung ist transzendent und kann nicht explizit gelöst werden. Die Funktion C=f(r) kann jedoch mittels eines Computers sehr genau angenähert werden. MC CARTY et al. (1968) konnten dabei zeigen, daß die Sedimentationsgeschwindigkeit von Polysomen verschiedener Aggregatgrößen über die gesamte Strecke eines solchen Gradienten konstant bleibt, wenn die richtigen Bedingungen erfüllt werden.

5. Abhängigkeit der Polysomenprofile vom Mengenverhältnis der mRNA zu den Ribosomen

Bei ihren Untersuchungen über die Bedeutung der Qualität von Ribosomen und Initiationsfaktoren für die Effizienz eines invitro Proteinsynthese-Systems, haben SCHREIER und STAEHELIN (1973) eine gegebene Menge Mausleber-Ribosomen mit mRNA titriert. Dabei stellten sie fest, daß bei Zunahme des Mengenverhältnisses der mRNA zu den Ribosomen eine Verschiebung des polysomalen Patterns in Richtung Monosomen stattfindet, während im umgekehrten Fall eine Akkumulation von schwereren Polysomen zu beobachten war.

Es scheint, als würde jedes Ribosom den Besitz eines eigenen mRNA Moleküls anstreben. Bei Unterangebot müssen sich dann mehrere Ribosomen in den Besitz eines einzigen mRNA-Moleküls teilen, und je knapper das Angebot an mRNA ist, desto schwerer sind die resultierenden Polysomen. Schließt man aus diesen in-vitro Ergebnissen auf in-vivo Verhältnisse, so würde z.B. eine Verschiebung im Polysomenprofil nach Applikation von Pharmaka in Richtung schwererer Polysomen auf eine Abnahme der mRNA-Konzentration bezogen auf die Ribosomenmenge in der Zelle deuten, während eine Verschiebung in

Richtung Monosomen eine Anreicherung des untersuchten Systems an mRNA andeuten würde. Da auch die RNAse- bzw. RNAse-Inhibitor-Aktivität das Polysomenprofil nachhaltig beeinflussen können, müssen experimentell bedingte Veränderungen im Polysomenprofil auf ihre wirkliche Ursache untersucht werden.
Eine Wirkung der RNAse bzw. des RNAse-Inhibitors kann ausgeschlossen werden, wenn der Zusatz eines RNAse-Inhibitors wie z.B. tRNA den Effekt nicht rückgängig macht. Ist der beobachtete Effekt hingegen aufgehoben worden, so muß auf die Wirkung der RNAse bzw. des RNAse-Inhibitors geschlossen werden, wobei natürlich auch diese Wirkung durch die medikamentöse Behandlung hervorgerufen werden kann.

Diese Interpretation der Veränderungen im Polysomenprofil infolge der Applikation embryotoxischer Substanzen wurde in der vorliegenden Arbeit als Arbeitshypothese zur Interpretation der Versuchsergebnisse verwendet.

II. Problemstellung

Während der Phase der Organogenese findet eine ausgeprägte Differenzierung des sich entwickelnden Embryos statt. Parallel zum allgemeinen Wachstum findet die Ausbildung verschiedener Organe statt, so daß in dieser Periode die Lebens- und Funktionsfähigkeit des gesamten entstehenden Lebewesens determiniert wird. In dieser besonders empfindlichen Wachstumsphase können bestimmte chemische Substanzen in die Differenzierungsvorgänge eingreifen und diese behindern, wodurch es im Laufe der Entwicklung zu bleibenden Schäden, wie z.B. Mißbildungen kommen kann. So kann z.B. eine Hemmung der Nukleinsäure - oder Proteinsynthese zum Fehlen eines Strukturproteins oder eines Enzyms, und damit zu einem bleibenden Schaden führen.

Die Erarbeitung von Methoden zur Erfassung von Änderungen und Störungen der Nukleinsäure- oder Proteinsynthese im embryonale Gewebe sind daher von erheblicher Bedeutung für die Erforschung der Mißbildungsphänomene.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es:

1. eine reproduzierbare Methode zur Erstellung von Polysomenprofilen zu entwickeln,
2. eine Methode zur quantitativen Erfas-

sung von Veränderungen im Polysomenprofil zu entwickeln,

3. zu untersuchen, ob zwischen den Polysomenprofilen aus adultem und embryonalem Gewebe der gleichen Spezies ein prinzipieller Unterschied besteht,
4. festzustellen, ob bei in-vivo Applikation teratogener bzw. embryotoxischer Substanzen charakteristische Veränderungen im Polysomenprofil auftreten.

Die Polysomen wurden als Untersuchungsobjekt gewählt, weil an ihnen die Proteinbiosynthese abläuft, deren Störung eventuell in Veränderungen im Polysomenprofil sichtbar gemacht werden könnten. So könnte z.B. die Inaktivierung der Initiationsfaktoren bzw. die Hemmung deren Synthese zu einem Verschwinden der schweren Polysomen führen, da diese während der Proteinsynthese von der mRNA ablaufen würden, ohne daß neue Ribosomen aufgereiht werden könnten. Die Inaktivierung der Translokationsfaktoren oder die Inhibierung deren Synthese könnte umgekehrt zur Akkumulation schwerer Polysomen führen, da das Ablaufen der Ribosomen von der mRNA behindert wäre, nicht aber das Aufreihen neuer Polysomen (jedenfalls bis die mRNA mit Ribosomen abgesättigt wäre). Weiter könnte die Hemmung der mRNA-Synthese aufgrund der Verarmung des zellulären Systems an mRNA zur Zunahme von Monosomen und zur

Abnahme der schweren Polysomen führen. Diese Erwartungen basierten auf der Beobachtung, daß verschiedene Substanzen, wie z.B. das karzinogene Dimethylnitrosamin (DELPINO und FERRINI 1973), der toxische Proteinsynthese-Hemmer Fusarenon-X (OHTSUBO et al. 1972) und der lebertoxische Tetrachlorkohlenstoff (CONGIN et al. 1972) Veränderungen am Polysomenprofil verursachen.

III. Methodik

1. Substanzen

1.1 Saccharose, RNAse-frei, D(+)-sucrose puriss. AR bact. Koch-Ligt Lab. LTD, Colnbrook-Bucks, Great Britain

1.2 Triton X-1oo, E. Merck AG Darmstadt

1.3 TES = Tris-(hydroxymethyl)-methyl-2-aminoäthan-sulfonsäure, Serva Feinchemikalien Heidelberg

1.4 Lösliche RNA (Bierhefe) p.a., C.F. Boehringer und Söhne GmbH Mannheim

2. Medien

2.1 Medium A (Homogenisationsmedium), bestehend aus:

Saccharose (RNAse-frei)	o,25o M
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	o,oo3 M
KCl	o,12o M
TES	o,oo2 M
pH	7,8

2.2 Medium B (Standardpuffer), bestehend aus:

$Mg(CH_3COO)_2$	o,oo5 M
KCl	o,12o M
TES	o,oo2 M
pH	7,8

2.3 Medium C (Gradientenlösung), bestehend aus:

Saccharose (RNAse-frei)	3o% bzw. 5o%(w/w)
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	o,oo5 M

KCl	o,12o M
TES	o,oo2 M
pH	7,8

2.4 Medium D (Triton X-1oo Lösung), bestehend aus:

Triton X-1oo	5% (v/v)
TES	o,oo2 M
pH	7,8

2.5 Medium E (1,38 M Saccharosekissen), bestehend aus:

Saccharose (RNAse-frei)	1,38o M
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	o,oo3 M
KCl	o,12o M
TES	o,oo2 M
pH	7,8

3. Versuchstiere und Schwangerschaftsdatierung

Als Versuchstiere dienten weibliche Albino-Ratten des Stammes Wistar SW 72 (Zuchtanstalt Winkelman, Paderborn), vom Gewicht 18o-22o g, und weibliche Albino Mäuse des NMRI-Stammes, vom Gewicht 2o-25 g.
Die Tiere erhielten Altromin R Futter und Leitungswasser ad libitum.
Um die untersuchten Embryonen in einem möglichst synchronen Entwicklungsstadium zu erhalten, wurden die männlichen und weiblichen Versuchstiere für nur zwei Stunden zusammengesetzt, und danach ein

Vaginalabstrich vorgenommen. Wurden Spermien entdeckt, so hat eine Begattung stattgefunden.
Die der Paarung folgende 24-Stunden-Periode wird als "Tag Null" bezeichnet.

4. Ribosomenpräparation

Die Versuchstiere wurden durch Dekapitieren getötet und ausgeblutet. Dies, wie auch sämtliche nachfolgenden Arbeiten wurde im Kühlraum bei 2 - 4° C durchgeführt.
Die Lebern und Embryonen wurden schnellstmöglich aus den Muttertieren herauspräpariert und mit eiskaltem Medium A gewaschen.
Danach wurde das Gewebe im Medium A aufgenommen (3 ml Medium A pro g Gewebe) und im Potter-Elvehjem Glas-Homogenisator mit Teflon Pistill durch 5 Auf- und Abbewegungen homogenisiert (125o rpm).
Bei Bedarf wurde dem Medium A lösliche RNA gegen RNAse-Einwirkung zugesetzt (o,5 mg RNA pro ml Medium A, kurz vor Bedarf).
Das Homogenat wurde zur Entfernung von Zellkernen und Mitochondrien 12 min. lang bei 12 ooo rpm (ca. 17 ooo x $g_{av.}$) in der MSE 18 High Speed zentrifugiert.
Der postmitochondriale Überstand wurde dekantiert und mit Medium D so versetzt, daß die Triton-Endkonzentration o,5% (v/v)

betrug.
Nach zehnminütiger Einwirkungsdauer des Detergens wurden je 8 ml dieser Suspension über je 3 ml des Medium E (Saccharose-Kissen) geschichtet und im Spinco 5o Ti Rotor bei 49 ooo rpm (ca. 165 ooo x $g_{av.}$) und 2° C 4 Stunden lang in der Spinco L-2 5o B Ultrazentrifuge zentrifugiert. Während so die Ribosomen und Polysomen durch das dichte Saccharose-Kissen sedimentierten, blieben die unerwünschten Komponenten, wie z.B. Fett, Ferritin und Hämoglobin in Zonen oberhalb des Kissens und konnten so nach Beendigung der Zentrifugation leicht durch Absaugen entfernt werden.
Das zurückgebliebene farblos-durchsichtige Sediment wurde 3 Mal mit je 5 ml des Mediums B gewaschen; danach konnten die Sedimente mehrere Monate lang ohne Aktivitätsverlust in flüssigem Stickstoff bei -196° C eingefroren und aufbewahrt werden.

5. Gradientenzentrifugation und Erstellung von Polysomenprofilen

In einer in Anlehnung an MC CARTY et al. (1968) aufgebauten Apparatur, bestehend aus einem Reservoir, einer Mischkammer und einer peristaltischen Vielkanalpumpe, wurden simultan jeweils 6 Gradienten von exponential-konvexem Verlauf hergestellt.

In die Mischkammer wurden vor Beginn der Prozedur 8o ml einer 3o%igen (w/w) Saccharoselösung gegeben, während in das Reservoir 9o ml einer 5o%igen (w/w) Saccharoselösung gegeben wurden.
Die Gradientenformmaschine befand sich in einer Kühltruhe, um schädlichen Konvektionsströmen entgegenzuwirken. Nach Fertigstellung der Gradienten wurde das zu untersuchende Ribosomensediment schnell in warmem Wasser aufgetaut, in 1o ml Medium B aufgenommen und vorsichtig darin suspendiert.
Je 1 ml dieser 8 - 1o O.D.-Einheiten pro ml enthaltenden Suspension wurde auf einen Gradienten gegeben und die sechs Gradienten im Spinco SW 41 Ti Rotor 165 min lang bei 4o ooo rpm (ca. 193 ooo x $g_{av.}$) und bei 2° C in der Spinco L-2 5o B Ultrazentrifuge zentrifugiert.
Nach Beendigung der Zentrifugation wurde das Gradientenröhrchen im ISCO Gradientenfraktionator 64o eingespannt und von unten her punktiert.

Mit konstanter Geschwindigkeit (1 ml pro min) wurde dann eine 7o%ige (w/w) Saccharoselösung von unten in das Röhrchen gepumpt, wodurch deren Inhalt langsam durch eine turbulenzfreie Durchflußzelle (NOLL 1971) verdrängt wurde. Während des Durchflußvorganges wurde automatisch durch den ISCO UV-Analysator UA 4 die UV-Absorption

(254 nm) des im Gradienten verteilten biologischen Materials registriert und durch einen Kompensationsschreiber in Form eines Polysomenprofils festgehalten.

Später wurde die Anlage dahingehend vervollständigt, daß sie mit einer Meßwertverarbeitungsanlage (Siemens AG) zur Erfassung analoger Meßwerte und deren Umwandlung in digitale Werte ausgerüstet wurde. Die Digitalwerte können parallel zur normalen Aufzeichnung des Polysomenprofils in einem Lochstreifen gestanzt werden, der einem Computer zwecks Auswertung des Profils eingefüttert werden kann.

6. Numerische Auswertung von Polysomenprofilen durch einen Computer

Da die Fläche unter dem einzelnen Peak im Polysomenprofil das Maß für die Menge des vorhandenen Aggregates ist, können quantitative Veränderungen im Polysomenprofil nur dann zuverlässig erkannt und quantifiziert werden, wenn man in der Lage ist, die Flächen unter den einzelnen nicht resolvierten Peaks zu berechnen und in Relation zur Gesamtfläche zu setzen. Da sich die Peaks, wie bereits erwähnt, im Profil gegenseitig stark überlappen, ist die Lösung dieses Problems sehr komplex und schwierig.

Es stehen vier grundlegende Verfahren zur Auswertung solcher Profile zur Verfügung:

1. Die Peaks werden rechts und links am jeweils benachbarten Minimum senkrecht nach unten abgeschnitten und die sich ergebenden Flächen durch Auswiegen oder automatische Integration bestimmt. Diese Methode ist allerdings ungenau.
2. An die ausgeprägten Maxima der Peaks werden zeichnerisch Funktionen angepaßt, deren Flächeninhalt wie unter 1. ermittelt wird. Auch diese Methode ist sehr ungenau.
3. Mehrere Gaußfunktionen werden auf einem Analogcomputer erzeugt, deren Parameter so lange nachjustiert werden, bis die Überlagerungen das vorgegebene Profil gut approximieren. Der Flächeninhalt der einzelnen Gaußkurven errechnet sich dann aus den Werten der angepaßten Parameter.
   Der Vorteil dieses letzten Verfahrens liegt darin, daß nicht die Gaußkurven einzeln, sondern deren Überlagerung im Gesamtbereich des Profils angepaßt wird, wodurch eine besonders hohe Genauigkeit erzielt wird. Diese hohe Genauigkeit ist es auch, die es erlaubt, die Parameter benachbarter Gaußkurven auch dann zu bestimmen, wenn diese sich stark überlappen.

4. Eine noch wesentlich elegantere Methode ist die Analyse einer Überlappung mehrerer Funktionen mittels eines Digital-Computers, wobei die mühselige Nachjustierung von Hand entfällt.

Ausgehend von der Annahme einer Gaußschen Verteilungsfunktion für Makromoleküle während eines Zentrifugationsvorganges (GEHATIA und KATCHALSKI 1959; VINOGRAD und BRUNNER 1966; SPRAGG und RANKIN 1967), und unter Berücksichtigung nicht-idealer Verhältnisse, wurde eine modifizierte Gaußfunktion der digitalen Auswertung der Polysomenprofile zugrundegelegt.
Für eine solche Funktion müssen folgende Kriterien gelten:

1. Der Exponent der Profilfunktion muß für den gesamten Bereich der Profilparameter und dem gesamten x-Bereich negativ sein.
2. Die Profilfunktion muß ein einfacher Ausdruck der dimensionslosen Variablen $X_k=(X-S_k)/B_k$ sein. Die reziproke quadrierte Breitenfunktion muß eine schnell konvergierende Reihe sein.

Ein einfacher solcher Ansatz ist die Funktion:

$$f(K) = \frac{FK}{\sqrt{\pi}\,B_K} \exp\left[-x_K^2\left(1+\sum_{j=1} c_j P(X_K)^j\right)\right] \qquad (38)$$

mit der Nebenbedingung $P(-X_k)=-P(X_k)$.
Dabei ist:

f_k= Verteilungsfunktion
F_k= Integrationskonstante mit der Bedeutung des Flächeninhaltes der Verteilung
B_k= Halbwertsbreite der Funktion
c_j= Profilparameter

Es liegt nahe, $P(X_k)$ so zu wählen, daß $P(X_k)^j$ für große $|X_k|$ konstant ist.

Eine solche Funktion ist z.B.:

$$P(X_k)=\tanh Z_k \quad \text{mit } Z_k=X_k/C_o \qquad (39)$$

Da eine spezifische F_k-Abhängigkeit der Profilfunktion im Ansatz (38) nicht berücksichtigt ist, sind die Profilparameter c_j im allgemeinen F_k-abhängig.

Das Kriterium für die Wahl der Funktion $P(X_k)$ war: Die Funktion ist geeignet, wenn man bei Berücksichtigung weniger Glieder der Reihe (38) eine gute Beschreibung der gaußförmigen Verteilungen des Profils erhält.
Die Kombination der Gleichung (38) mit Gleichung (39) bildet die Profilfunktion:

(40)

$$f(x)=\sum_{k=1}^{M}\frac{F_k}{\sqrt{\pi}\,B_k}\exp\left\{-\left(\frac{x-x_k}{B_k}\right)^2\left[1+C_1\tanh\left(\frac{x-s_k}{c_o B_k}\right)+C_2\tanh^2\left(\frac{x-s_k}{c_o B_k}\right)\right]\right\}$$

Die Anpassung der entsprechenden Profilparameter erfolgte mittels des FORTRAN Programms DIANA auf dem Computer CDC 7200 der Freien Universität Berlin.
Für die Parameteranpassung wurde die Methode der minimalsten Quadrate (LUDWIG 1969) verwendet, d.h. $F_K, S_K, B_K, c_0, c_1, c_2$ sind so zu bestimmen, daß

$$Chi(F_K, S_K, B_K, c_0, c_1, c_2) = \sum_{i=1}^{N} [y_i - f(F_K, S_K, B_K, c_0, c_1, c_2, x_i)]^2 / \Delta y_i^2 \qquad (41)$$

minimal wird.
x und y sind die n digitalisierten Wertepaare des Profils und Δy ist der Fehler des Trenn- und Meßverfahrens.
Neben den Parameterwerten erhielt man bei der Auswertung Chi als Maß für die Genauigkeit der Auswertung, eine Korrelationsmatrix als Maß für die wechselseitige Überlagerung, sowie ein Protokoll der Anfangswerte der Parameter, der eigentlichen Anpassung und natürlich die berechneten Einzelflächen als Prozentangaben der Gesamtfläche (siehe Anhang).

An dieser Stelle sei Herrn Dr. E. TRÄNKLE vom Institut für theoretische Physik der Freien Universität Berlin für die Über-

lassung seines Computerprogrammes und für seine uneigennützige Hilfe herzlich gedankt.

7. Graphische Darstellung der Computerauswertung

Die numerische Auswertung der Polysomenprofile, vom Computer als Fläche unter den einzelnen Peaks (in % der Gesamtfläche unter dem Polysomenprofil) angegeben, wurde außer in tabellarischer auch in graphischer Form dargestellt, um Trends in der Größenverteilung der Polysomen deutlicher und in leicht überschaubarer Form aufzuzeigen. Dabei wurden in einem Koordinatensystem auf der Abszisse die Peaks in forlaufender Reihenfolge, wie sie im Profil auftreten, aufgetragen.

Auf der Ordinate wurden die Differenzen zwischen den Flächen korrespondierender Peaks von Kontroll- und Versuchsergebnissen aufgetragen. So wurde z.B. von der Fläche des Monomerenpeaks des Versuchsergebnisses die Fläche des Monomerenpeaks des Kontrollversuches abgezogen und die Differenz als Absolutprozent-Angabe auf der Ordinate aufgetragen. Das gleiche wiederholte sich für den Dimerenpeak und so weiter (siehe Abb. 1).
Bei Versuchen, die sich mehrmals wiederholten, oder bei Dosis- bzw. Zeitabhängigkeitsversuchen, wurde von jedem "Teil-

ergebnis" der ihm allein zugehörige Kontrollwert abgezogen. In einer graphischen Darstellung solcher "komplexer" Versuche wurden also mehrere "reduzierte" Versuchsergebnisse gleichzeitig dargestellt. Dabei konnten praktisch die unter Umständen differierenden Kontrollen aus der Darstellung weggelassen werden, was die Übersichtlichkeit erhöhte. Wurden hingegen nicht die Differenzwerte, sondern die Absolutwerte einschließlich Kontrollwerte graphisch dargestellt, so ergaben die mitunter voneinander abweichenden Kontrollwerte ein unübersichtliches, ja oft sogar irreführendes Bild.

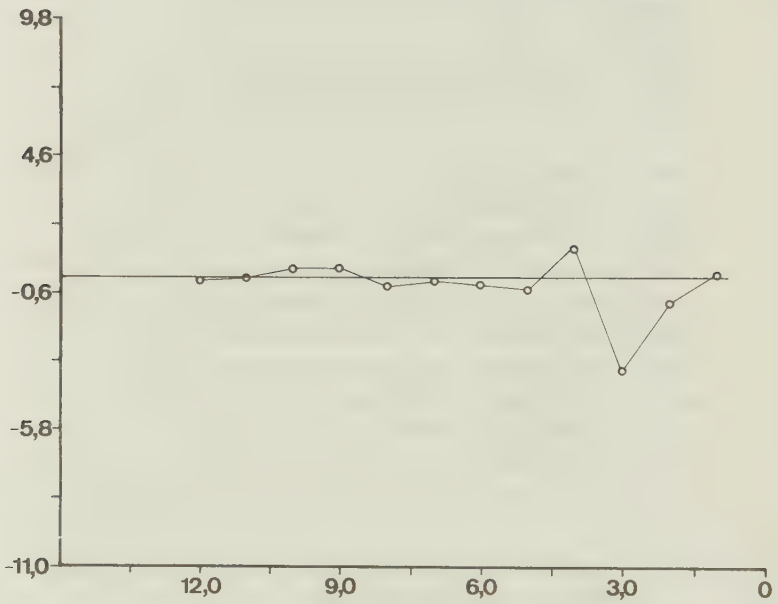


Abbildung 1

Graphische Darstellung der Computerauswertung von Polysomenprofilen aus Mäuseembryonen am Tag 12 der Gestation mit (o—o) und ohne (Bezugswert = Nullinie) tRNA-Zusatz. Auf der Ordinate sind die Differenzwerte zwischen den Flächen korrespondierender Peaks von Versuch und Kontrolle aufgetragen. Auf der Abszisse sind die Positionen der einzelnen Aggregate von rechts nach links aufgetragen.

IV. Versuchsergebnisse und Diskussion

1. Ermittlung geeigneter Zentrifugationsbedingungen zur Erstellung von Polysomenprofilen

Die in der Literatur angegebenen Parameter zur Erstellung von Polysomenprofilen weichen stark voneinander ab. So bewegen sich die Angaben über den Konzentrationsverlauf der Gradienten zwischen 1o % - 3o % (YAMAGAMI et al. 197o) und 15 % - 5o % (RAGNOTTI 1971), die der angewendeten Zentrifugalwirkung zwischen 585 x $1o^4$g x min (OLSNES 1971) und 1ooo x $1o^4$g x min (DOWBEN et al. 1968) und die über die Zentrifugationsdauer zwischen 4o min (KAMATH et al. 1971) und 14 Stunden (BAGLIONI et al. 1971). Es war daher zweckmäßig, die für unsere Zwecke optimalen Zentrifugationsbedingungen selbst zu ermitteln.

Als Rotor wurde der Spinco SW 41 Ti Rotor gewählt, da er den besten Kompromiß zwischen der Länge der Trennstrecke und der wirksamen Zentrifugalkraft bietet.

Die Zentrifugationsläufe wurden in der Beckman Spinco L-2 5o B Ultrazentrifuge bei 2° C durchgeführt.

Um ein optimales Polysomenprofil zu erhalten, sollte sich die Auftrennung der einzelnen Partikel über einen möglichst großen Bereich der im Gradienten zur Ver-

fügung stehenden Trennstrecke erstrecken.

Die Anfangs- und Endkonzentrationen der untersuchten Gradienten, deren Verlauf (linear, exponentiell) und die Zentrifugationsdauer und -geschwindigkeit wurden so lange variiert, bis die besten Ergebnisse erzielt wurden.
Als optimale Zentrifugationsbedingungen zur Erstellung von Polysomenprofilen erwiesen sich:

1. ein exponential-konvexer Gradient, nahezu isokinetisch
2. ein Konzentrationsverlauf von 3o % → 5o % (w/w)
3. eine Umdrehungszahl von 4o ooo rpm (ca. 195 ooo x $g_{av.}$)
4. eine Zentrifugationsdauer von 165 min.

Die unter diesen Bedingungen erhaltenen Polysomenprofile zeigten in guter Auflösung die große und kleine Untereinheit (4o S und 6o S), das Monosom (8o S), Disom (123 S), das Trisom (154 S), das Tetrasom (183 S), das Pentasom (211 S) und so weiter, bis einschließlich Aggregate von 13 Ribosomen (siehe Abb. 2)

2. Vergleich der Eigenschaften der Rotoren SW 41 Ti und SW 65 Ti bezüglich der Erstellung von Polysomenprofilen

Da in Zukunft Untersuchungen an einzelnen Embryonen und sogar an Organen einzelner

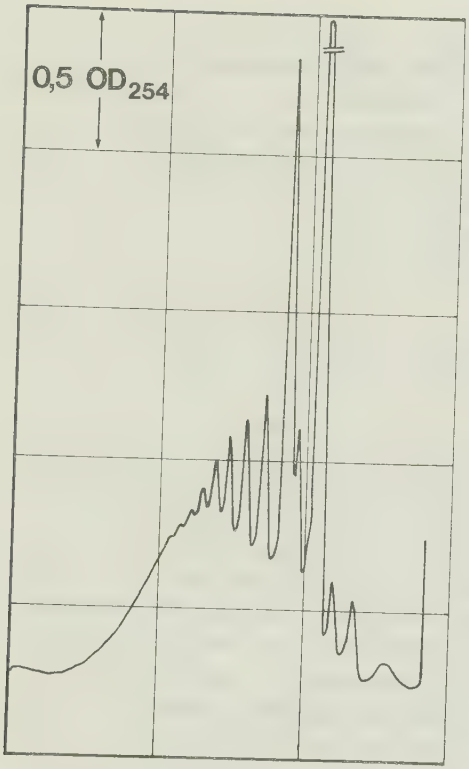


Abbildung 2

Beispiel für ein besonders gut aufgelöstes Polysomenprofil von Mäuseembryonen am Tag 12 der Gestation. Exponential-konvexer Saccharosegradient (3o % - 5o % w/w), Zentrifugationsdauer 165 min bei 4oooo rpm im Spinco SW 41 Rotor.

Embryonen unumgänglich werden, und da solche Untersuchungen die Verwendbarkeit kleinster Materialmengen zur Erstellung von Polysomenprofilen voraussetzen, wurde neben dem bereits beschriebenen Gradienten noch ein zweiter gesucht, der diesen Anforderungen genügen würde.
Als geeigneter Rotor erschien uns der Spinco SW 65 Ti, der ein kleines Volumen mit großer Drehzahl verbindet. Als besonders geeignet erwies sich ein exponential-konvexer Gradient mit dem Konzentrationsverlauf 12 % - 3o % (w/w). Die Zentrifugationsdauer betrug dabei 2o min bei 6o ooo rpm (ca. 265 ooo x $g_{av.}$; ca. 53o x $1o^4$ g x min). Das Volumen des Gradienten betrug nur 4,8 ml (beim SW 41 11,5 ml). Während der SW 41 Rotor mit 1 ml pro Gradient (8 - 1o O.D. Einheiten) beladen wurde, genügten für den SW 65 Rotor o,2 ml (2 O.D. Einheiten) pro Gradient. Für den SW 65 Rotor genügt also rund 1/4 bis 1/5 der für den SW 41 Rotor benötigten Materialmenge.
Ein Vergleich der in beiden Rotoren gewonnenen Polysomenprofile zeigt, daß der SW 41, wie erwartet, über ein größeres Auflösungsvermögen verfügt als der SW 65. Sowohl die Trennung der beiden Subunits voneinander und von den Monosomen als auch die Auftrennung im Bereich schwererer Aggregate (n>6) ist beim SW 65 schlechter

als beim SW 41 (siehe Abb. 3a und 3b). Dennoch kann das im SW 65 gewonnene Polysomenprofil als gut bezeichnet werden.

Berücksichtigt man den wesentlich geringeren Materialbedarf des SW 65 Rotors, der für Untersuchungen am einzelnen Embryo von großer Bedeutung ist, und bedenkt man die sehr kurze Zentrifugationsdauer von nur 2o min (beim SW 41 165 min), so ist der SW 65 Rotor für solche Untersuchungen dem SW 41 Rotor überlegen und sollte dann benutzt werden.

3. Biologische und methodische Meßwert-Schwankungen bei den durchgeführten Versuchen

Bei jeder Untersuchung, bei der Meßwerte gewonnen werden, ist es wichtig, die Meßwert-Schwankungsbreite zu kennen, um Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrollwerten richtig beurteilen zu können und entscheiden zu können, ob diese relevant und signifikant sind.
Bei den durchgeführten Experimenten waren zwei Arten von Meßwertstreuungen zu erwarten:
1. Die biologische Streuung
2. Die methodische Streuung
Die biologische Streuung wird durch die individuellen, teilweise genetisch bedingten Unterschiede zwischen einzelnen Individuen einer Tierspezies verursacht.

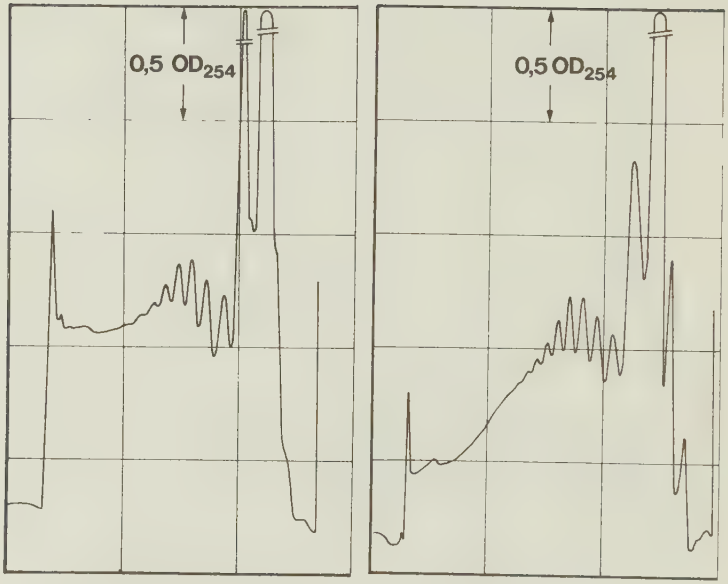


Abbildung 3

Vergleich des Auflösungsvermögens der Rotoren SW 41 (b) und SW 65 (a). Zentrifugationsbedingungen: Im SW 41 exponentialkonvexer Saccharose-Gradient (3o % - 5o % w/w), 165 min bei 4oooo rpm.
Im SW 65: Exponential-konvexer Gradient (12 % - 3o % w/w), 2o min bei 6oooo rpm.

Hinzu kommen individuelle Unterschiede im Gesundheits- und Ernährungszustand der einzelnen Tiere.
Die methodische Streuung kann z.B. durch die nicht vollkommene Reproduzierbarkeit bei der Herstellung der Gradienten bedingt werden; ebenso wirken apparativ bedingte Unregelmäßigkeiten bei der Ultrazentrifugation, Fehler in der UV-Optik und vor allem die niemals völlig identisch zu gestaltende Resuspension der Polysomen, bei der eine unkontrollierbare Degradation der mRNA und damit der Polysomen vorkommen kann.
Es war daher von großer Wichtigkeit, den Umfang der biologisch und methodisch bedingten Meßwert-Schwankungen zu kennen, um die Versuchsergebnisse richtig interpretieren zu können.

3.1 Biologische Streuung bei Polysomenprofilen

Um die Größe der biologischen Streuung ermitteln zu können, wurden jeweils drei Versuche an drei Systemen durchgeführt:
An Mäuseembryonen am Tag 11 bzw. 12 der Gestation und an Mäuselebern.
Für jedes dieser drei Systeme wurde der Durchschnittswert der Flächen der jeweils korrespondierenden drei Peaks und dazu die Standardabweichung gebildet:

$$\bar{x} = \frac{\Sigma (m_i x_i)}{\Sigma m_i}$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{\Sigma (m_i x_i^2) - \frac{1}{\Sigma m_i} (\Sigma m_i x_i)^2}{(\Sigma m_i) - 1}}$$

$\bar{X}$ = Durchschnittswert der drei Peakflächen
n = Anzahl der Meßgrößen (hier jeweils 3)
X_i = Werte der einzelnen Flächen
σ = Standardabweichung vom Mittelwert

Ferner wurde die Standardabweichung eines jeden einzelnen Mittelwertes als Prozentangabe des Mittelwertes errechnet, von diesen prozentualen Standardabweichungen wurde wiederum der Mittelwert für das gesamte abgeschlossene System (d.h. z.B. für die drei Versuche mit den Mäuselebern) errechnet: $\bar{X}(\sigma)$.
Aus den drei $\bar{X}(\sigma)$ der Versuchssysteme wurde schließlich wiederum der Mittelwert errechnet, und dieser $\bar{\bar{X}}(\sigma)$-Wert wurde dann als die allgemeine, biologisch bedingte Streuung (in %) in der vorliegenden Arbei verwendet.
Im einzelnen ergaben sich folgende Werte:

1. bei Mausembryonen am Tag 11 der Gestation: $\bar{X}(\sigma) = 21{,}0\ \%$
2. bei Mausembryonen am Tag 12 der Gestation: $\bar{X}(\sigma) = 12{,}9\ \%$
3. bei Mäuselebern: $\bar{X}(\sigma) = 24{,}4\ \%$

(siehe Tabellen 1, 2 und 3).

Der daraus resultierende Mittelwert betrug demnach:

$$\bar{\bar{X}}(\sigma) = 19{,}4\ \% \pm 5{,}9$$

Unter Zugrundelegung dieses Wertes und der ihm zugehörigen Standardabweichung wurden nur Differenzen zwischen Versuchs- und Kontrollwert, die größer als 25 % - 3o % waren, als relevant bzw. signifikant akzeptiert.
Diese hohe Meßwertschwankung ist bei biologischen Systemen nicht ungewöhnlich und muß leider in Kauf genommen werden. Wir sind uns bewußt, daß drei Versuche an drei Systemen keine echte und zuverlässige Statistik ergeben können. Da es aber nicht als Ziel dieser Arbeit zu betrachten war, eine statistische Aussage über biologische Schwankungen zu machen, wurde dieser Nachteil bewußt akzeptiert.

ME_{11}	ME_{11}	ME_{11}	$\bar{X}$	$\sigma[\%\bar{X}]$
1,5	1,8	2,5	1,9 ± o,5	± 26,o %
1,9	3,3	2,9	2,7 ± o,7	± 26,o %
19,5	18,6	25,2	21,1 ± 3,6	± 17,1 %
3,2	4,1	5,8	4,4 ± 1,3	± 29,5 %
8,9	8,9	1o,3	9,5 ± 1,1	± 11,6 %
8,3	5,5	6,7	6,8 ± 1,4	± 2o,6 %
7,6	7,2	6,2	7,o ± o,7	± 1o,o %
6,8	5,1	4,4	5,4 ± 1,2	± 22,2 %
6,5	5,5	3,9	4,7 ± 1,1	± 23,4 %
5,3	5,3	3,8	5,o ± 1,o	± 2o,o %
3,6	4,5	2,9	3,7 ± o,8	± 21,6 %
4,6	6,5	4,2	5,1 ± 1,2	± 23,5 %

$\bar{X}(\sigma) = \pm 21,o\ \% \pm 5,7$

Tabelle 1

Biologische Streuung bei Polysomenprofilen aus Mäuseembryonen am Tag 11 der Gestation.

Angegeben werden die Flächenwerte der einzelnen Peaks als Prozentangaben der Gesamtflächen der Profile. ME_{11} bedeutet Mäuseembryonen am Tag 11 der Gestation. Ferner werden die Mittelwerte der Flächen der einzelnen Peaks ($\bar{X}$) und die zugehörigen absoluten (σ) und prozentualen ($\sigma[\%\bar{X}]$) Standardabweichungen angeben. $\bar{X}(\sigma)$ stellt den Mittelwert der $\sigma[\%\bar{X}]$-Werte dar.

ME_{12}	ME_{12}	ME_{12}	$\bar{X}$			$\sigma[\%\bar{X}]$	
2,o	1,6	1,6	1,7	±	o,2	±	12 %
3,9	3,3	4,1	3,8	±	o,4	±	11 %
27,4	24,o	26,4	25,9	±	1,7	±	7 %
4,2	5,3	5,7	5,1	±	o,8	±	16 %
9,3	8,1	11,6	9,7	±	1,8	±	19 %
4,9	7,3	6,2	6,1	±	1,2	±	2o %
5,7	5,6	6,9	6,1	±	o,7	±	11 %
5,o	5,2	7,1	5,8	±	1,2	±	21 %
4,3	5,3	5,8	5,1	±	o,8	±	16 %
4,2	4,3	4,1	4,2	±	o,1	±	2 %
3,8	3,3	3,6	3,6	±	o,3	±	8 %
4,9	5,9	4,7	5,2	±	o,6	±	12 %

$\bar{X}(\sigma\%) = \pm 12{,}9\ \% \pm 5{,}7$

Tabelle 2

Biologische Streuung bei Polysomenprofilen aus Mäuseembryonen am Tag 12 der Gestation.

Angegeben werden die Flächenwerte der einzelnen Peaks als Prozentangaben der Gesamtflächen der Profile. ME_{12} bedeutet Mäuseembryonen am Tag 12 der Gestation. Ferner werden die Mittelwerte der Flächen der einzelnen Peaks ($\bar{X}$) und die zugehörigen absoluten (σ) und prozentualen ($\sigma[\%\bar{X}]$) Standardabweichungen angegeben. $\bar{X}(\sigma)$ stellt den Mittelwert der $\sigma[\%\bar{X}]$-Werte dar.

ML	ML	ML	$\bar{X}$	$\sigma[\%\bar{X}]$
3,5	6,1	2,6	4,1 ± 1,8	± 43,9 %
4,2	4,9	3,o	4,o ± 1,o	± 25,o %
11,1	11,1	9,9	1o,7 ± o,7	± 6,5 %
4,2	2,7	2,o	3,o ± 1,1	± 36,7 %
4,5	6,3	9,2	6,7 ± 2,4	± 35,8 %
5,6	7,1	9,o	7,2 ± 1,7	± 23,6 %
4,5	6,6	8,4	6,5 ± 2,o	± 3o,8 %
4,9	6,1	7,4	6,1 ± 1,2	± 19,7 %
5,1	6,2	6,9	6,1 ± o,9	± 14,8 %
5,4	5,7	6,4	5,8 ± o,5	± 8,6 %
4,5	3,9	4,2	4,2 ± o,3	± 7,1 %
6,5	2,8	5,8	5,o ± 2,o	± 4o,o %

$\bar{X}(\sigma) = \pm 24,4 \quad \pm 13,2$

Tabelle 3

Biologische Streuung bei Polysomenprofilen aus Mäuselebern.

Angegeben werden die Flächenwerte der einzelnen Peaks als Prozentangaben der Gesamtflächen der Profile. ML bedeutet Mäuseleber. Ferner werden die Mittelwerte der Flächen der einzelnen Peaks ($\bar{X}$) und die zugehörigen absoluten (σ) und prozentualen ($\sigma[\%\bar{X}]$) Standardabweichungen angegeben. $\bar{X}(\sigma)$ stellt den Mittelwert der $\sigma[\%\bar{X}]$-Werte dar.

3.2 Methodische Streuung bei Polysomenprofilen

Aus den gleichen Gründen, die die Kenntnis der biologischen Streuung nötig machten, mußte auch die Größe der methodischen Streuung ermittelt werden. Um die biologische Streuung dabei auszuschließen, wurde eine einzige Ribosomenpräparation, die in drei Portionen vorlag, getrennt resuspendiert, die Suspension auf drei verschiedene Gradienten überschichtet und drei getrennten Zentrifugationsläufen unterworfen.

Auch hier wurden aus den Flächen der drei jeweils korrespondierenden Peaks der Mittelwert und die Standardabweichung errechnet (als absolute und prozentuale Angabe). Aus den prozentualen Standardabweichungen wurde wiederum der Mittelwert samt Standardabweichung gebildet und der so erhaltene $\bar{\bar{X}}(\sigma)$-Wert als methodische Streuung im Rahmen der vorliegenden Arbeit betrachtet.

Wie erwartet, war die methodische Meßwert-Schwankung mit $\bar{\bar{X}}(\sigma)$ = 6,2 %±5,1 (siehe Tabelle 4) wesentlich niedriger als die biologische Streuung. Daß sie insgesamt für eine methodische Streuung recht hoch ist, liegt in erster Linie an den unkontrollierbaren Effekten während der Resuspendierung des polysomalen Sediments. Dabei kann die mRNA durch Scherkräfte und Wärmeentwicklung degradiert werden, wo-

Gradient 1	Gradient 2	Gradient 3	$\bar{X}$			$\sigma[\%\bar{X}]$	
2,5	3,2	2,8	2,8	±	o,4	±	14 %
1,9	1,5	2,o	1,8	±	o,3	±	17 %
12,2	11,7	11,9	12,o	±	o,2	±	2 %
7,3	7,4	7,1	7,3	±	o,2	±	3 %
17,3	16,o	17,o	16,8	±	o,7	±	4 %
11,6	1o,8	11,2	11,2	±	o,4	±	4 %
1o,3	1o,2	1o,3	1o,3	±	o,6	±	6 %
7,6	7,9	7,5	7,7	±	o,2	±	3 %
7,8	7,7	7,8	7,8	±	o,1	±	1 %
8,o	7,4	7,7	7,7	±	o,3	±	4 %
6,o	5,4	5,6	5,7	±	o,3	±	5 %
6,1	5,o	5,2	5,4	±	o,6	±	11 %

$\bar{X}(\sigma\%) = \pm 6,2\ \% \pm 5,1$

Tabelle 4

Methodische Streuung bei Polysomenprofilen am Beispiel von 6-MP-Einwirkung.

Angegeben werden die Flächenwerte der einzelnen Peaks als Prozentangaben der Gesamtflächen der Profile. Ferner werden die Mittelwerte der Flächen der einzelnen Peaks ($\bar{X}$) und die zugehörigen absoluten (σ) und prozentualen ($\sigma[\%\bar{X}]$) Standardabweichungen angegeben. $\bar{X}(\sigma)$ stellt den Mittelwert der $\sigma[\%\bar{X}]$-Werte dar.

durch ein Unsicherheitsfaktor in die methodische Streuung eingebracht wird.

4. Einfluß von tRNA als RNA-Kompetitor auf Polysomenprofile

Wie bereits erwähnt (I.1.3 und I.2.3), stellen RNAsen, die bei der Polysomenisolierung aus den Kernen oder Lysosomen freigesetzt werden können, die größte Gefahr für die Integrität der Polysomen dar. Da sich niedermolekulare lösliche tRNA als guter Zusatz gegen RNAse-Einwirkung erwiesen hat (GERLINGER et al. 1973), wurde sie in unserem System eingesetzt, um zu sehen, ob und welchen Einfluß sie auf die Polysomenprofile hat.
Es wurden jeweils kurz vor der Homogenisation in einem Teil des Mediums A (Homogenisationsmedium) o,5 mg lösliche RNA pro ml gelöst. Je die Hälfte des zu untersuchenden Gewebes wurde in RNA-haltigem bzw. -nichthaltigem Medium A homogenisiert und aus dem Homogenat wie üblich Polysomen isoliert. So sollte verhindert werden, daß biologisch bedingte Unterschiede ein falsches Bild vermittelten.
Die aus den Versuchen mit tRNA-haltigem Medium gewonnenen Ergebnisse waren recht aufschlußreich.
In früheren Versuchen, bei denen keine tRNA zugesetzt wurde, wiesen die Profile von Rattenleber-Polysomen wenige schwerere

Aggregate auf und bestanden fast ausschließlich aus Mono-, Di- und Trisomen, während Profile von Rattenembryonen-Polysomen große Mengen schwerer Aggregate aufwiesen (siehe Abb. 4). Es stellte sich die Frage, ob dieses Bild den in-vivo Verhältnissen entspricht und so einen in-vivo vorhandenen Unterschied in der Polysomengrößenverteilung zwischen Rattenleber und Rattenembryonen wiedergibt, oder ob der beobachtete Unterschied auf unterschiedliche RNAse- bzw. RNAse-Inhibitor-Aktivität zurückzuführen ist, die erst beim Homogenisieren zum Tragen kommen (und natürlich ebenfalls ein prinzipieller Unterschied zwischen Leber- und Embryogewebe wäre). Der Vergleich der Profile von Rattenleber-Polysomen, die mit und ohne tRNa-Zusatz isoliert wurden, zeigt, daß der Zusatz der tRNA eine wesentlich höhere Ausbeute an schwereren Polysomen liefert. Die unter diesen Bedingungen erhaltenen Profile ähneln denen, die aus Rattenembryonen gewonnen wurden (siehe Abb. 5a und 5b).
Man hat hier ebenfalls ein vollständiges Spektrum der verschiedenen polysomalen Aggregate, wie dies bei den Rattenembryonen schon ohne tRNA-Zusatz der Fall war. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, daß die vorher gefundenen Unterschiede im Polysomenprofil von Rattenleber und Ratten-

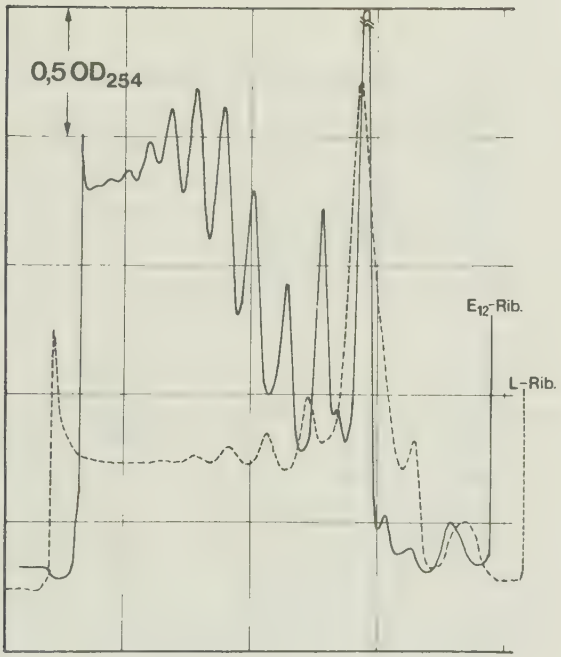


Abbildung 4

Polysomenprofile von Rattenleber (-----) und Rattenembryonen am Tag 12 der Gestation (———) ohne Zusatz von tRNA als RNAse-Inhibitor.
Saccharose-Gradient (exponential-konvex, 3o % - 5o % w/w), Zentrifugationsdauer 165 min bei 4oooo rpm im Spinco SW 41 Rotor.

a b

Abbildung 5

Polysomenprofile von Rattenlebern mit (b) und ohne (a) Zusatz von tRNA als RNAse-Inhibitor. Exponential-konvexer Saccharose-Gradient (3o % - 5o % w/w), Zentrifugationsdauer 165 min bei 4oooo rpm im Spinco SW 41 Rotor.

embryonen nicht dem in-vivo Bild entsprechen, sondern auf einem prinzipiellen Unterschied in der RNAse- bzw. RNAse-Inhibitor-Aktivität der beiden Gewebe beruhen. Dabei muß die Rattenleber entweder über eine höhere RNAse- oder über eine niedrigere RNAse-Inhibitor-Aktivität verfügen als der Rattenembryo.
Dieses Ergebnis war deshalb überraschend, weil verschiedene Autoren (ROTH 1958; BLOBEL und POTTER 1966; LAWFORD et al. 1966; SUGANO et al. 1967) gerade aus der Rattenleber einen endogenen RNAse-Inhibitor isoliert haben, der die Degradation von Polysomen verhindern soll. Es wäre deshalb angebracht zu versuchen, auch aus embryonalem Gewebe einen endogenen RNAse-Inhibitor zu isolieren und die Aktivität der beiden Inhibitoren zu vergleichen.
Anders verhält es sich bei Mäusen. Profile von aus Mäuselebern bzw. aus Mäuseembryonen isolierten Polysomen zeigen keine solchen signifikanten Unterschiede wie bei der Ratte.
Beide Profilarten weisen das gleiche Grössenverteilungsspektrum auf, mit beträchtlichen Mengen schwerer Aggregate. Der Zusatz von tRNA zum Homogenisierungsmedium bewirkt keine signifikante Veränderung der Profile aus Mäuselebern bzw. -embryonen (siehe Tabelle 5 und 6 und Abb. 6 und 7).

ML+tRNA	MLØtRNA	Δ %	ML+tRNA	MLØtRNA	Δ %	$\bar{X}$	σ
4,5	3,5	- 22 %	3,8	3,3	- 13 %	- 17,5 %	± 6,4
5,6	4,1	- 27 %	4,8	5,3	+ 1o %	- 8,5 %	± 26,2
11,5	11,o	- 4 %	7,5	8,4	+ 12 %	+ 4,o %	± 11,3
3,2	2,6	- 19 %	3,6	1,o	- 72 %	- 45,5 %	± 37,5
6,9	7,3	+ 6 %	5,3	5,1	- 4 %	+ 1,o %	± 7,1
9,o	9,8	+ 9 %	8,7	6,4	- 26 %	- 8,5 %	± 24,7
8,6	8,5	- 1 %	7,5	6,o	- 7 %	- 4,o %	± 4,2
7,5	8,4	+ 12 %	7,6	6,o	- 21 %	- 4,5 %	± 23,3
6,5	6,8	+ 5 %	7,5	6,8	- 9 %	- 2,o %	± 9,9
6,2	6,7	+ 8 %	6,4	6,3	- 2 %	+ 3,o %	± 7,1
4,8	4,8	± o %	5,2	4,5	- 13 %	- 6,5 %	± 9,2
5,6	8,o	+ 43 %	5,7	6,2	+ 9 %	+ 26,o %	± 24,o

Tabelle 5
Einfluß von tRNA auf Polysomenprofile von Mäuselebern.

Angegeben werden die Flächenwerte der einzelnen Peaks als Prozentangaben der Gesamtflächen der Profile. ML + tRNA bzw. ML Ø tRNA bedeuten Mäuseleber mit und ohne tRNA-Zusatz. Ferner werden die Differenzen zwischen den korrespondierenden Flächen in % der ML + tRNA - Werte (Δ %), der Mittelwert $\bar{X}$ der Δ %-Werte und die zugehörigen Standardabweichungen σ angegeben.

ME_{13} + tRNA	ME_{13} ∅ tRNA	Δ [%]
1,8	1,9	+ 6 %
3,1	4,6	+ 48 %
22,o	26,o	+ 18 %
4,3	4,6	+ 7 %
13,5	1o,6	- 21 %
3,7	5,5	- 49 %
7,6	6,1	- 2o %
5,1	5,3	+ 4 %
4,2	3,8	- 1o %
5,2	4,1	- 21 %
3,8	3,1	- 18 %
4,4	4,4	± o %

Tabelle 6

Einfluß von tRNA auf Polysomenprofile von Mäuseembryonen am Tag 13 der Gestation.

Angegeben werden die Flächenwerte der einzelnen korrespondierenden Peaks als Prozentangaben der Gesamtflächen der Profile. ME_{13} + tRNA und ME_{13} ∅ tRNA bedeuten Mäuseembryonen am Tag 13 der Gestation mit und ohne tRNA-Zusatz. Ferner werden die Differenzen zwischen den korrespondierenden Flächen in % der ME_{13}+ tRNA-Werte (Δ %), die Mittelwerte $\bar{X}$ der Δ%-Werte und die zugehörigen Standardabweichungen σ angegeben.

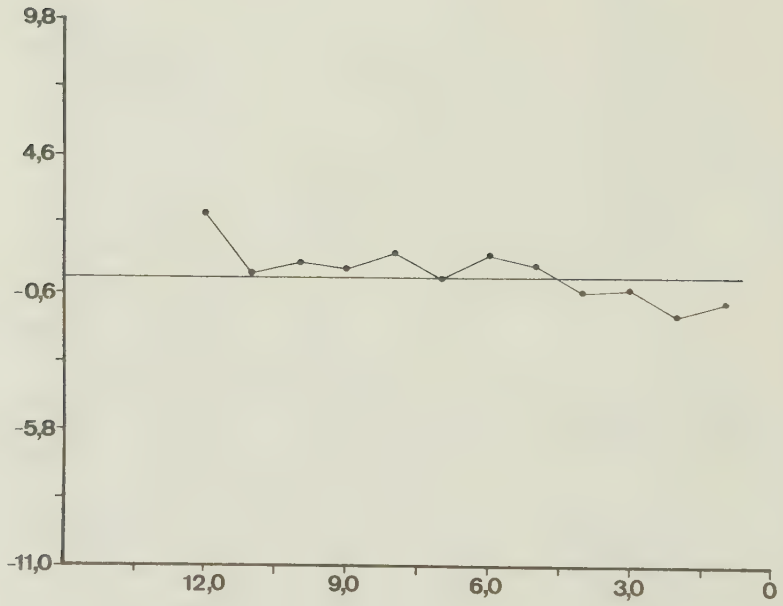


Abbildung 6

Graphische Darstellung der Computerauswertung von Polysomenprofilen aus Mäuseleber mit(Bezugswert ≙ Nullinie) und ohne tRNA-Zusatz (•– –•) gegen RNAse-Einwirkung. Auf der Abszisse sind die Positionen der Aggregate von rechts nach links aufgetragen. Auf der Ordinate sind die Differenzen zwischen den Flächen der korrespondierenden Flächen (bei Zusatz und Ausschluß von tRNA) aufgetragen.

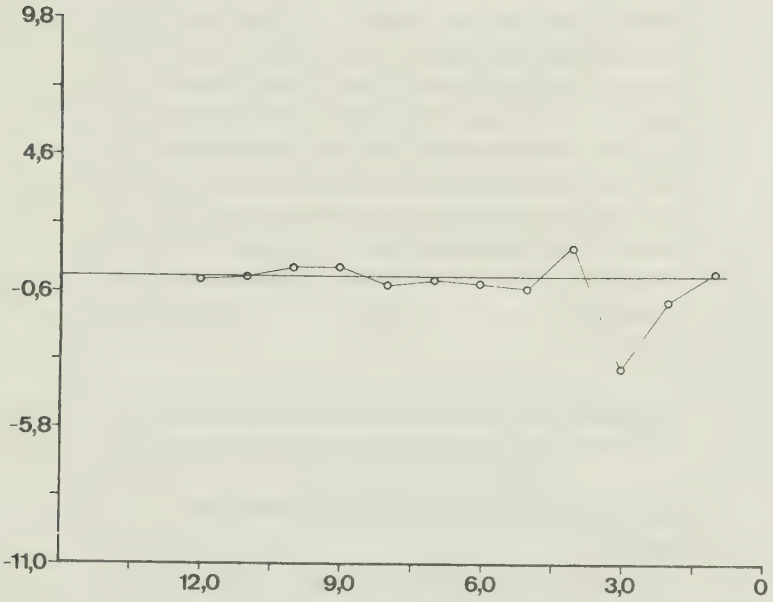


Abbildung 7

Graphische Darstellung der Computerauswertung von Polysomenprofilen aus Mäuseembryonen am Tag 12 der Gestation mit (o—o) und ohne tRNA-Zusatz (Bezugswert ≙ Nullinie) gegen RNAse-Einwirkung.
Auf der Abszisse sind die Positionen der Aggregate von rechts nach links aufgetragen. Auf der Ordinate sind die Differenzen in den Flächen der korrespondierenden Peaks aufgetragen.

Daraus kann man schließen, daß bei der Maus einerseits keine signifikanten Unterschiede in der RNAse- bzw. RNAse-Inhibitor-Aktivität zwischen Leber und Embryo besteht (im Gegensatz zu den Verhältnissen bei der Ratte) und daß andererseits die Mäuseleber über eine niedrigere RNAse- bzw. über eine höhere RNAse-Inhibitor-Aktivität verfügt als die Rattenleber.

5. Polysomenprofile von Rattenembryonen in den Tagen 12, 13, 14 und 15 der Gestation

5.1 Embryonale und fetale Entwicklung der Ratte

Die Entwicklung von der befruchteten Eizelle bis zur Geburt wird bei der Ratte in vier Stadien unterteilt:

1. Die Präimplantationsphase, die vom Tag 0 bis zum Tag 4 der Gestation dauert.
   In dieser Zeit durchläuft die befruchtete Eizelle viele Zellteilungen und erreicht schließlich das Stadium eines Blastocysten.
2. Die frühe Postimplantations- und Organogenesephase bis zur Plazentation.
   Diese Phase dauert vom Tag 8 bis zum Tag 11 der Gestation. Im zweiten Teil dieses Zeitabschnittes findet die Bildung von Urdarm, Kopffortsatz und Herz-

schlauch statt.

3. Die fetale Wachstums- und Differenzierungsphase, die vom Tag 12 bis zum Tag 16 der Gestation dauert.
Dabei bilden sich am Tag 12 die vorderen Extremitätenknospen, und das Wachstum ist besonders intensiv. So verdoppelt sich die Länge des Embryos vom Tag 12 zum Tag 13 der Gestation.
Am Tag 12 erfährt ferner der Herzschlauch weitere Differenzierung, und die Leber wird sichtbar.
Am Tag 13 erreichen die Primitivorgane den Höhepunkt ihrer Entwicklung.
Vom Tag 13 zum Tag 14 verlangsamt sich das Wachstum, während eine intensive Differenzierung stattfindet.
Besonders die Gesichtsregion entwickelt sich zu diesem Zeitpunkt. Ferner sind die vorderen Extremitäten bereits in distale und proximale Regionen unterteilt, und die ersten Schritte zur Geschlechtsdifferenzierung können beobachtet werden.
Am Tag 15 verdoppelt sich wieder die Größe des Foeten. Die Kopfregion wird weiter entwickelt, die Zunge gebildet und die Gestaltung des Hörganges beginnt, ebenso die Differenzierung der hinteren Extremitäten.
Am Tag 16 ist die Bildung des Knorpelskelettes bereits weit fortgeschritten.

4. Die Perinatal-Phase, die vom Tag 17 der Gestation bis zum Tag 3 nach der Geburt dauert.
Vom Tag 17 der Gestation bis zur Geburt wird das Gehirn stark differenziert, die Finger gebildet, das Skelett nimmt die endgültige Form an und die Geschlechtsorgane werden gebildet.

5.2 Vergleich der Polysomenprofile von Rattenembryonen in den Tagen 12, 13, 14 und 15 der Gestation

Es interessierte uns, ob während der verschiedenen Entwicklungs- und Differenzierungsphasen des Embryos unterschiedliche Polysomenprofile erhalten werden.

Da in den ersten beiden Phasen das Gewicht und die Größe der Embryonen sehr gering sind und die Isolierung der Polysomen daher zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht möglich ist, wurden die Untersuchungen auf die fetale Wachstums- und Differenzierungsphase beschränkt, in der ebenfalls große Wachstums- und Differenzierungsleistungen vollbracht werden.
Zu diesem Zweck wurden aus Rattenembryonen, die sich in den Tagen 12, 13, 14 und 15 der Gestation befanden, Polysomen isoliert und deren Profile analysiert.
Die vom Computer errechneten Flächen unter den korrespondierenden Peaks wurden miteinander verglichen, wobei die Werte, die

am Tag 15 gewonnen wurden, als Bezugssystem dienten und von den entsprechenden Werten der anderen Tage abgezogen wurden. Diese Differenzwerte wurden zum einen in Relation zu den Bezugswerten (Tag 15) gesetzt und als prozentuale Abweichung aufgefaßt (siehe Tabelle 7) und zum anderen wurden diese Differenzwerte graphisch aufgetragen, um die evtl. vorhandenen Tendenzen besser sichtbar zu machen (siehe Abb. 8).
Dabei zeigte sich, daß zwischen den Tagen 13, 14 und 15 der Gestation keine signifikanten Unterschiede in der Mengenverteilung der Polysomen festzustellen waren. Am Tag 12 der Trächtigkeit jedoch lagen die Werte für die schwereren Aggregate (Hexa-, Hepta- und Oktasomen) um 33 %, 38 % und 56 % über den entsprechenden Werten des Tages 15 (siehe Tabelle 7 und Abb. 8).
Unter Berücksichtigung der unter 1.5 entwickelten Interpretationsweise der Polysomenprofile könnte aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, daß am Tag 12 der Gestation in den Zellen von Rattenembryonen das Mengenverhältnis der mRNA zu den Ribosomen geringer ist als in den darauffolgenden Tagen. Möglicherweise wird in den Tagen 13, 14 und 15 aufgrund der besonders starken Differenzierungsvorgänge mehr mRNA pro Zelle und Ribosomen benötigt als am Tag 12, obwohl an diesem Tag gerade

das Wachstum besonders ausgeprägt ist. Allerdings sollte eine andere Interpretationsmöglichkeit, die speziell für die Differenzierungsvorgänge im Embryo zutreffen könnte, nicht übersehen werden: Gerade aufgrund der zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten auftretenden Zellen mit spezieller Funktion könnte die Veränderung im Polysomenprofil erklärt werden. Werden z.B. zu einem Zeitpunkt Zellen produziert, in denen hochmolekulare Proteine gebildet werden, so werden im Polysomenprofil die schwereren Aggregate dominieren. Entstehen zu einem späteren Zeitpunkt andere Zellen, in denen niedermolekulare Proteine synthetisiert werden, so dominieren dort die leichteren Polysomen. Das Hinzukommen dieser Zellen zu den ersteren könnte ebenfalls zu Veränderungen im Polysomenprofil führen, wie sie in den oben beschriebenen Versuchen auftraten.

RE_{12}	Δ [%]	RE_{13}	Δ [%]	RE_{14}	Δ [%]	RE_{15}
0,6	± 0 %	0,3	- 50 %	0,2	- 67 %	0,6
0,8	- 43 %	0,6	- 57 %	0,3	- 43 %	1,4
9,5	- 13 %	10,3	- 5 %	11,1	+ 3 %	10,8
3,7	+ 32 %	3,2	+ 14 %	3,9	+ 39 %	2,8
5,5	- 17 %	6,5	- 2 %	7,1	+ 8 %	6,6
8,2	- 4 %	7,8	- 8 %	9,4	+ 11 %	8,5
9,5	+ 1 %	8,6	- 9 %	9,4	± 0 %	9,4
11,6	+ 9 %	10,2	- 4 %	11,1	+ 5 %	10,6
10,8	+ 33 %	8,2	+ 1 %	7,6	- 6 %	8,1
10,2	+ 38 %	7,1	- 4 %	7,7	+ 4 %	7,4
8,6	+ 56 %	5,0	- 9 %	5,4	- 2 %	5,5
7,8	+ 10 %	6,0	- 15 %	5,0	- 30 %	7,1

Tabelle 7

Polysomenprofile von Rattenembryonen in den Tagen 12, 13, 14 und 15 der Gestation.

Angegeben werden die Flächenwerte der einzelnen korrespondierenden Peaks als Prozentangaben der Gesamtflächen der Profile. RE_{12}, RE_{13}, RE_{14} und RE_{15} bedeuten Rattenembryonen in den Tagen 12, 13, 14 und 15 der Gestation. Ferner werden die Differenzen zwischen den korrespondierenden Flächen in % der RE_{15}-Werte (Δ %), die Mittelwerte $\bar{X}$ der Δ %-Werte und die zugehörigen Standardabweichungen σ angegeben.

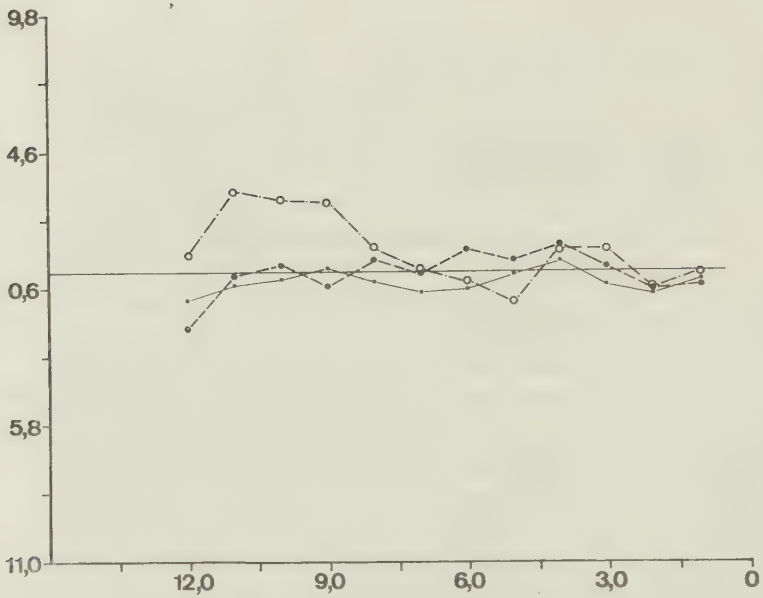


Abbildung 8

Graphische Darstellung der Computerauswertung embryonaler Polysomenprofile aus Rattenembryonen in den Tagen 12 (o–·–·–o), 13 (●– –■), 14 (● – –●) und 15 (Bezugswert ≙ Nullinie) der Gestation. Auf der Abszisse sind die Positionen der Aggregate von rechts nach links aufgetragen. Auf der Ordinate sind die Differenzen zwischen den Flächen der korrespondierenden Peaks aufgetragen, wobei die Flächen am Tag 15 als Bezugswert dienen.

6. Polysomenprofile von Mäuseembryonen in den Tagen 11, 12 und 13 der Gestation

6.1 Embryonale und fetale Entwicklung bei der Maus

Bei der Maus verläuft die Entwicklung von der befruchteten Eizelle bis zur Geburt ähnlich wie bei der Ratte. Durch die um rund 2 Tage kürzere Tragzeit der Maus sind jedoch die Entwicklungsphasen zeitlich verschoben. So dauert die Präimplantations-Phase zwar ebenfalls vom Tag o bis zum Tag 4 der Gestation, die frühe Postimplantations- und Organogenese-Phase jedoch dauert nur vom Tag 6 bis zum Tag 9 der Gestation, die fetale Wachstums- und Differenzierungs-Phase vom Tag 1o bis zum Tag 14 und die Perinatal-Phase vom Tag 15 der Gestation bis zum Tag 3 nach der Geburt.

6.2 Vergleich der Polysomenprofile von Mäuseembryonen in den Tagen 11, 12 und 13 der Trächtigkeit

Parallel zu den Untersuchungen an Rattenembryonen sollte auch bei Mäuseembryonen untersucht werden, ob die verschiedenen Wachstums- und Differenzierungsvorgänge in den verschiedenen Entwicklungsstadien charakteristische Unterschiede in den Polysomenprofilen bewirken. Es lag natürlich nahe, die den Rattenembryonen analo-

gen Entwicklungsstadien zu untersuchen, weshalb bei der Maus die Tage 11, 12 und 13 (entsprechend den Tagen 13, 14 und 15 bei der Ratte) untersucht wurden. Auch hier wurden die Werte der Flächen unter den korrespondierenden Peaks miteinander verglichen, wobei der Tag 13 als Bezugssystem diente.
Während am Tag 12 der Gestation die Mengenverteilung der Polysomen nicht signifikant von der des 13. Gestationstages abwich, war am Tag 11 die Menge der Monosomen um 40 % niedriger als am Tag 13, während die Menge der Hexa-, Hepta- und Oktasomen um 28 %, 29 % und 36 % über den entsprechenden Werten des 13. Tages lagen (siehe Tabelle 8 und Abb. 9).
Wie bei der Ratte war also auch bei der Maus zu beobachten, daß in den frühesten untersuchten Entwicklungsstadien ein grösserer Anteil schwerer Polysomen vorhanden war als in den späteren untersuchten Entwicklungsstadien, was in analoger Weise zu interpretieren ist: In den früheren untersuchten Entwicklungsstadien der Mäuseembryonen ist in den Zellen das Mengenverhältnis der mRNA zu den Ribosomen niedriger als in den späteren untersuchten Stadien, bzw. aufgrund der zu verschiedenen Zeitpunkten verschiedenen dominierenden Zelltypen, die verschieden große Proteinmoleküle synthetisieren, ist das dadurch bedingte unter-

ME_{11}	Δ[%]	ME_{12}	Δ[%]	ME_{13}
1,8	± o %	1,6	- 11 %	1,8
3,3	- 21 %	3,3	- 21 %	4,2
18,6	- 4o %	24,o	- 23 %	31,o
4,1	- 27 %	5,3	- 5 %	5,6
8,9	+ 33 %	8,1	+ 21 %	6,7
5,5	+ 2 %	7,3	+ 35 %	5,4
7,2	+ 22 %	5,6	- 5 %	5,9
5,1	+ 13 %	5,2	+ 16 %	4,5
5,5	+ 28 %	5,3	+ 23 %	4,3
5,3	+ 29 %	4,3	+ 5 %	4,1
4,5	+ 36 %	3,3	± o %	3,3
3,4	+ 36 %	3,1	+ 24 %	2,5

Tabelle 8

Polysomenprofile von Mäuseembryonen in den Tagen 11, 12 und 13 der Gestation.

Angegeben werden die Flächenwerte der einzelnen korrespondierenden Peaks als Prozentangaben der Gesamtflächen der Profile. ME_{11}, ME_{12} und ME_{13} bedeuten Mäuseembryonen in den Tagen 11, 12 und 13 der Gestation. Ferner werden die Differenzen zwischen den korrespondierenden Flächen in % der ME13-Werte (Δ%), die Mittelwerte $\bar{X}$ der Δ%-Werte und die zugehörigen Standardabweichungen σ angegeben.

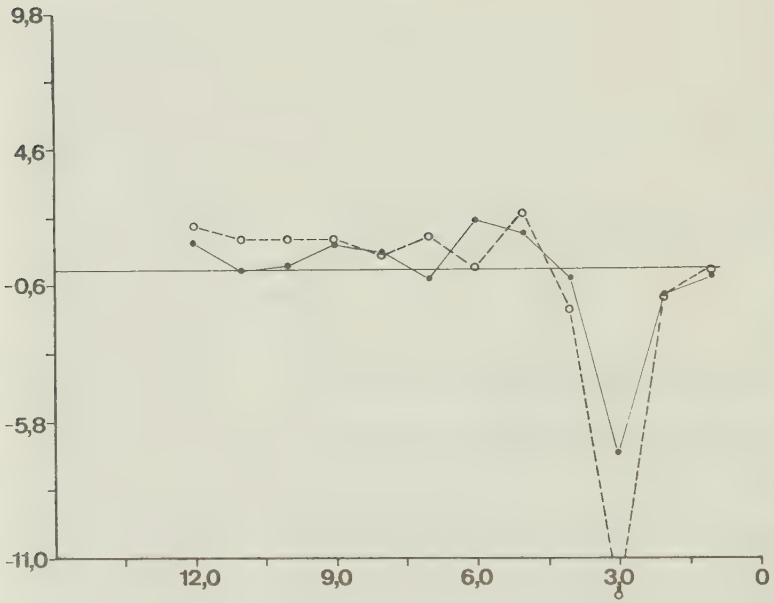


Abbildung 9

Graphische Darstellung der Computerauswertung embryonaler Polysomenprofile aus Mäuseembryonen in den Tagen 11 (o---o), 12 (•——•) und 13 (Bezugswert = Nullinie) der Gestation.
Auf der Abszisse sind die Positionen der Aggregate von rechts nach links aufgetragen. Auf der Ordinate sind die Differenzen zwischen den Flächen der korrespondierenden Peaks aufgetragen, wobei die Flächen am Tag 13 als Bezugswert dienen.

schiedliche Muster der mRNA die Ursache für die beobachteten Unterschiede in den Polysomenprofilen.

7. Vergleich der Polysomenprofile von Mäuse- und Rattenembryonen analoger Entwicklungsstadien

Während der experimentellen Arbeit mit zwei verschiedenen Tierspezies (Ratte und Maus) tauchte die Frage auf, ob es charakteristische Unterschiede zwischen den Polysomenprofilen der Embryonen beider Spezies gibt.
Um diese Frage zu beantworten, wurden jeweils die Profile von Mäuse- und Rattenembryonen analoger Entwicklungsstadien untersucht und verglichen (d.h. Tag 11 der Maus mit Tag 13 der Ratte, Tag 12 der Maus mit Tag 14 der Ratte und Tag 13 der Maus mit Tag 15 der Ratte).
Für die graphische Darstellung (siehe Abb. 1o) wurden jeweils die Flächenwerte der Mäusepolysomen-Peaks von den entsprechenden Werten der Rattenpolysomen-Peaks subtrahiert und die resultierenden Differenzwerte auf der Ordinate aufgetragen.
Die so gewonnene graphische Darstellung zeigte einen deutlichen Unterschied in der Mengenverteilung der Polysomen zwischen Mäuse- und Rattenembryonen analoger Entwicklungsstadien. So findet man stets bei den Rattenembryonen eine geringere Menge

Monosomen und Disomen als bei den entsprechenden Mäuseembryonen, während die Menge der schwereren Aggregate bedeutend größer ist. In Zahlen ausgedrückt war die Menge der Mono- bzw. Disomen um 3o % - 5o % geringer als bei Mäuseembryonen, während die Menge der Trisomen um durchschnittlich 43 %, der Tetrasomen um 43 %, der Pentasomen um 49 %, der Hexasomen sogar um 116 %, der Heptasomen um 6o %, der Oktasomen um 64 % und die Menge der Nonasomen um 47 % höher als bei Mäuseembryonen war (siehe Tabelle 9 und Abb. 1o). Interessant war ferner die Beobachtung, daß in allen untersuchten Entwicklungsstadien die größte Differenz in den Ribosomenmengen auf die Pentasomen entfiel. Eine einleuchtende Erklärung für die gefundenen Unterschiede zwischen Ratten- und Mäuseembryonen kann zur Zeit noch nicht gegeben werden. Es scheint unwahrscheinlich, daß in den gewählten analogen Entwicklungsstadien grundsätzlich verschiedenartige Zellen entstehen, bei denen aufgrund der gänzlich verschiedenen zu synthetisierenden Proteine ein anderes Muster im Polysomenprofil auftreten würde. Vielleicht ist es ein artspezifischer Unterschied, daß die Zellen von Rattenembryonen reicher an mRNA pro Ribosomen sind, als die Zellen von Mäuseembryonen.

ME_{11}	RE_{13}	Δ [%]	ME_{12}	RE_{14}	Δ [%]	ME_{13}	RE_{15}	Δ [%]	$\bar{X}$	σ
1,8	o,3	- 83 %	1,6	o,2	- 87 %	1,8	o,6	- 67 %	- 79,o %	± 1o,6
3,3	o,6	- 82 %	3,3	o,8	- 76 %	4,2	1,4	- 67 %	- 75,o %	± 7,6
18,6	1o,3	- 45 %	24,o	11,1	- 54 %	31,o	1o,8	- 65 %	- 54,7 %	± 1o,o
4,1	3,2	- 22 %	5,3	3,9	- 26 %	5,6	2,8	- 5o %	- 32,7 %	± 15,1
8,9	6,5	- 27 %	8,1	7,1	- 12 %	6,7	6,6	- 1 %	- 13,3 %	± 13,o
5,5	7,8	+ 42 %	7,3	9,4	+ 29 %	5,4	8,5	+ 57 %	+ 42,7 %	± 14,o
7,2	8,6	+ 19 %	5,6	9,4	+ 68 %	5,9	9,4	+ 59 %	+ 4o,7 %	± 26,o
5,1	1o,2	+ 1oo %	5,2	11,1	+ 113 %	4,5	1o,6	+ 136 %	+ 116,3 %	± 1o,2
5,5	8,2	+ 49 %	5,3	7,6	+ 43 %	4,3	8,1	+ 88 %	+ 6o,o %	± 24,4
5,3	7,1	+ 34 %	4,3	7,7	+ 79 %	4,1	7,4	+ 8o %	+ 64,3 %	± 26,3
4,5	5,o	+ 11 %	3,3	5,4	+ 64 %	3,3	5,5	+ 67 %	+ 47,3 %	± 31,5
3,4	6,o	+ 76 %	3,1	5,o	+ 61 %	2,5	7,1	+ 184 %	+ 1o7,o %	± 67,o

Tabelle 9

Polysomenprofile von Mäuse- und Rattenembryonen analoger Entwicklungsstadien.

Angegeben werden die Flächenwerte der einzelnen korrespondierenden Peaks als Prozentangaben der Gesamtflächen der Profile. MEx bzw. RE_y entsprechen Mäuse- bzw. Rattenembryonen der entsprechenden Entwicklungstage. Ferner werden die Differenzen zwischen den korrespondierenden Flächen in % der ME_x-Werte (Δ %), die Mittelwerte $\bar{X}$ der Δ %-Werte und die zugehörigen Standardabweichungen σ angegeben.

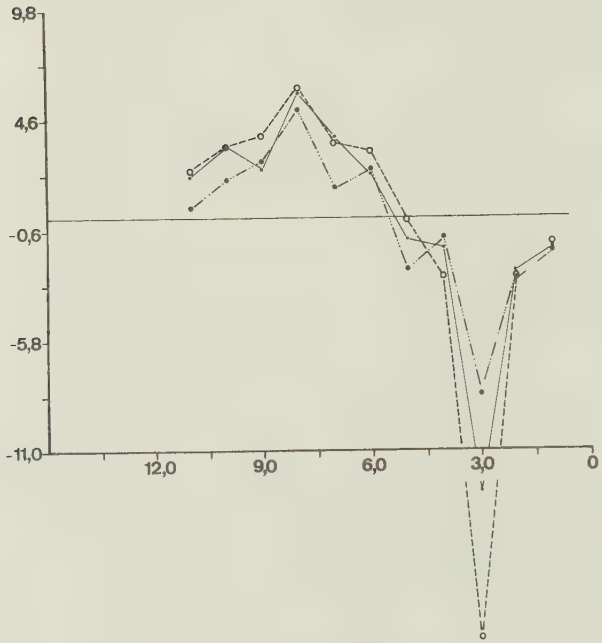


Abbildung 1o

Graphische Darstellung der Computerauswertung der Polysomenprofile aus Rattenembryonen der Tage 13 (●——●), 14 (■——■) und 15 (o---o) und aus Mäuseembryonen der Tage 11, 12 und 13 der Gestation (jeweils Bezugswerte = Nullinie).
Auf der Abszisse sind die Positionen der Aggregate von rechts nach links aufgetragen. Auf der Ordinate sind die Differenzen zwischen den Flächen der korrespondierenden Peaks der analogen Entwicklungsstadien von Maus und Ratte aufgetragen. Die Werte der Mäuseembryonen dienen als Bezugswerte.

8. Vergleich der Polysomenprofile von Mäuseembryonen der Entwicklungstage 11, 12 und 13 mit den Polysomenprofilen der zugehörigen mütterlichen Leber

8.1 Leber- und Embryogewebe als Untersuchungsmodell

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit stellte sich die Frage, ob zwei in ihrer Beschaffenheit und Funktion sehr verschiedene Gewebearten unterschiedliche Polysomenprofile aufweisen. Als Modell wurde neben dem embryonalen das Lebergewebe der Muttertiere gewählt.

Das Gewebe eines sich entwickelnden Embryos unterliegt einem intensiven Differenzierungs- und Wachstumsprozeß. So wächst z.B. im Zeitraum vom Tag 11 zum Tag 12 der Gestation das Feucht- bzw. Trockengewicht eines Rattenembryos um das Sechsfache, ebenso sein Gehalt an DNA, während sein RNA-Gehalt um das Vierfache anwächst (KÖHLER et al. 1972). Das embryonale Gewebe weist demnach eine hohe Proliferationsrate und hohe Syntheseleistung auf.

Bei der adulten Leber liegen andere Verhältnisse vor. Zwar verfügt die Leber über eine hohe Syntheseleistung (so werden in der Leber z.B. eine große Zahl von Enzymen wie die Cholinesterase, die Leucinaminopeptidase und die 5-Nukleotidase wie auch nichtenzymatische Proteine wie z.B. die

Gerinnungsfaktoren und die Plasmaproteine mit Ausnahme der Immunglobuline synthetisiert), die Proliferationsrate der erwachsenen Leber hingegen ist äußerst gering.
Aus diesen Gründen wurde an Polysomenprofilen aus beiden Gewebearten untersucht, ob prinzipielle Unterschiede in den Profilen bestehen.

8.2 Polysomenprofile von Mäuselebern und -embryonen

Die aus den Polysomen der Mäuseembryonen der Entwicklungstage 11, 12 und 13 und aus den zugehörigen mütterlichen Lebern erstellten Profile wurden durch den Computer analysiert und berechnet.
Die so berechneten Flächen unter den korrespondierenden Peaks wurden verglichen, indem die Flächen der einzelnen Peaks der embryonalen Profile von den korrespondierenden Flächen der Leberprofile subtrahiert wurden und die Differenzwerte zum einen in die graphische Darstellung (siehe Abb. 11, 12 und 13) und zum anderen als Prozentangabe des Bezugssystems ausgedrückt wurden (siehe Tabellen 1o, 11 und 12). Dabei wurde festgestellt, daß durch alle untersuchten Entwicklungstage hindurch derselbe Trend zu beobachten war. Die Monosomenmenge in den Leberprofilen war um 51 % bis 65 % geringer als in den

embryonalen Profilen, die Menge der schwereren Aggregate dagegen um durchschnittlich 3o % bis 4o % größer (siehe Tabellen 1o, 11 und 12).
Dieser Trend ist am ausgeprägtesten am Tag 13 der Gestation und am schwächsten am Tag 11 der Gestation.
Wenn auch die Einzelwerte der Flächendifferenzen nicht weit oberhalb der Signifikanzschranke liegen, so kann man dennoch diesen Trend als erwiesen betrachten, da er in insgesamt je drei Versuchen in den drei Entwicklungstagen stets reproduzierbar auftrat.
Daraus läßt sich schließen, daß die erwachsene Leber über weniger mRNA pro Ribosom und Zelle verfügt als das sich entwickelnde embryonale Gewebe.
Tatsächlich war zu erwarten, daß das Embryogewebe, das im Gegensatz zum Lebergewebe auch noch über eine hohe Proliferationsrate verfügt, auch reicher an mRNA sein müßte.

ME_{11}	ML	Δ [%]	ME_{11}	ML	Δ [%]	ME_{11}	ML	Δ [%]	$\bar{X}$	σ
1,[illegible]	3,7	+ 1o6 %	2,5	6,1	+ 144 %	1,5	2,6	+ 73 %	+ 1o7,7 %	± 35,5
3,5	5,1	+ 46 %	2,9	4,9	+ 69 %	1,9	3,o	+ 58 %	+ 57,7 %	± 11,5
22,3	11,4	- 49 %	25,2	11,1	- 56 %	19,5	9,9	- 49 %	- 51,3 %	± 4,o
7,8	2,[illegible]	- 64 %	5,8	2,7	- 53 %	3,2	2,o	- 37 %	- 51,3 %	± 13,6
7,4	7,o	- 5 %	1o,3	6,3	- 42 %	8,9	9,2	+ 3 %	- 14,7 %	± 24,o
8,2	8,9	+ 9 %	6,7	7,1	+ 6 %	8,3	9,o	+ 8 %	+ 7,7 %	± 1,5
7,3	8,2	+ 12 %	6,2	6,6	+ 6 %	7,6	8,4	+ 11 %	+ 8,8 %	± 3,1
6,6	7,6	+ 15 %	4,4	6,1	+ 39 %	6,[illegible]	7,4	+ 9 %	+ 21,o %	± 15,9
5,3	6,6	+ 14 %	3,9	6,2	+ 59 %	6,5	6,9	+ 6 %	+ 26,3 %	± 23,6
5,4	6,5	+ 2o %	3,8	5,7	+ 5o %	5,8	6,4	+ 1o %	+ 26,7 %	± 2o,8
2,7	4,8	+ 78 %	2,9	3,9	+ 34 %	3,6	4,2	+ 17 %	+ 43,o %	± 31,5
5,9	6,5	+ 1o %	4,2	2,8	- 33 %	4,6	5,8	+ 26 %	+ 1,o %	± 3o,5

Tabelle 1o
Vergleich der Polysomenprofile von Mäuseembryonen am Tag 11 der Gestation mit Profilen der mütterlichen Lebern.

Angegeben werden die Flächenwerte der einzelnen korrespondierenden Peaks als Prozentangaben der Gesamtflächen der Profile. ME_{11} bedeutet Mäuseembryonen am Tag 11 der Gestation, ML bedeutet Mäuselebern. Ferner werden die Differenzen zwischen den korrespondierenden Flächen in % der ME_{11}-Werte (Δ %), der Mittelwert $\bar{X}$ der Δ%-Werte und die zugehörigen Standardabweichungen σ angegeben.

ME_{12}	ML	Δ [%]	ME_{12}	ML	Δ [%]	ME_{12}	ML	Δ [%]	$\bar{X}$		σ
2,5	6,1	+ 144 %	1,7	4,5	+ 165 %	1,6	3,5	+ 119 %	+ 142,7 %	±	23,0
2,9	4,9	+ 69 %	3,1	5,6	+ 81 %	4,1	4,1	0 %	0,0 %		
25,2	11,1	- 56 %	22,8	11,5	- 50 %	26,4	11,0	- 58 %	- 54,7 %	±	4,2
5,[illegible]	2,7	- 53 %	6,8	3,2	- 53 %	5,7	2,6	- 54 %	- 53,3 %	±	0,6
10,[illegible]	6,3	- 42 %	11,1	6,9	- 38 %	11,6	7,3	- 37 %	- 39,0 %	±	2,6
6,7	7,1	+ 6 %	5,9	9,0	+ 53 %	6,2	9,8	+ 58 %	+ 39,0 %	±	28,7
6,2	6,6	+ 6 %	6,7	8,6	+ 31 %	6,9	8,5	+ 23 %	+ 20,0 %	±	12,8
4,4	6,1	+ 39 %	6,7	7,5	+ 12 %	7,1	8,4	+ 18 %	+ 23,0 %	±	14,2
3,9	6,2	+ 59 %	6,1	6,5	+ 7 %	5,8	6,8	+ 17 %	+ 27,7 %	±	27,6
3,8	5,7	+ 50 %	4,4	6,2	+ 41 %	4,1	6,7	+ 63 %	+ 51,3 %	±	11,1
2,9	3,9	+ 34 %	3,5	4,8	+ 37 %	3,6	4,8	+ 33 %	+ 34,7 %	±	2,1
4,2	2,8	- 33 %	4,5	5,6	+ 24 %	4,7	8,0	+ 70 %	+ 20,3 %	±	51,6

Tabelle 11

Vergleich der Polysomenprofile von Mäuseembryonen am Tag 12 der Gestation mit Profilen der mütterlichen Lebern.

Angegeben werden die Flächenwerte der einzelnen korrespondierenden Peaks als Prozentangaben der Gesamtflächen der Profile. ME_{12} bedeutet Mäuseembryonen am Tag 12 der Gestation, ML bedeutet Mäuselebern. Ferner werden die Differenzen zwischen den korrespondierenden Flächen in % der entsprechenden ME_{12}-Werte (Δ %), die Mittelwerte $\bar{X}$ der Δ %-Werte und die zugehörigen Standardabweichungen σ angegeben.

ME_{13}	ML	%	ME_{13}	ML	%	ME_{13}	ML	%	$\bar{X}$	σ
1,8	3,5	+ 94 %	1,9	3,2	+ 1o6 %	1,8	3,8	+ 111 %	+ 1o3,7 %	± 3,7
4,2	4,2	± o %	4,6	5,2	+ 11 %	3,1	4,8	+ 55 %	+ 22,o %	± 29,1
31,o	11,1	- 64 %	26,o	8,8	- 66 %	22,o	7,5	- 66 %	- 65,3 %	± 1,2
5,6	4,2	- 25 %	5,5	1,2	- 78 %	4,3	3,6	- 16 %	- 39,7 %	± 33,5
6,7	4,5	- 33 %	1o,6	4,9	- 54 %	13,5	5,3	- 61 %	- 49,3 %	± 14,6
5,4	5,6	+ 4 %	5,5	6,4	- 16 %	3,7	8,7	+ 135 %	+ 41,o %	± 82,o
5,9	4,5	- 24 %	6,1	6,o	- 2 %	7,6	7,5	- 1 %	- 9,o %	± 13,o
4,5	4,9	+ 11 %	5,3	6,2	+ 17 %	5,1	7,6	+ 49 %	+ 25,7 %	± 2o,4
4,3	5,1	+ 19 %	3,8	6,7	+ 76 %	4,2	7,5	+ 79 %	+ 58,o %	± 33,8
4,1	5,4	+ 32 %	4,1	6,5	+ 58 %	5,2	6,4	+ 23 %	+ 37,7 %	± 18,2
3,3	4,5	+ 36 %	3,1	4,7	+ 52 %	3,8	5,2	+ 37 %	+ 41,7 %	± 9,o
4,8	6,5	+ 35 %	4,4	5,6	+ 27 %	4,4	5,7	+ 3o %	+ 3o,7 %	± 4,o

Tabelle 12
Vergleich der Polysomenprofile von Mäuseembryonen am Tag 13 der Gestation mit Profilen aus den zugehörigen mütterlichen Lebern.

Angegeben werden die Flächenwerte der einzelnen korrespondierenden Peaks als Prozentangaben der Gesamtflächen der Profile. ME_{13} bedeutet Mäuseembryo am Tag 13 der Gestation, ML bedeutet Mäuseleber. Ferner werden die Differenzen zwischen den korrespondierenden Flächen in % der entsprechenden ME_{13}-Werte (Δ%), die Mittelwerte $\bar{X}$ der Δ%-Werte und die zugehörigen Standardabweichungen σ angegeben.

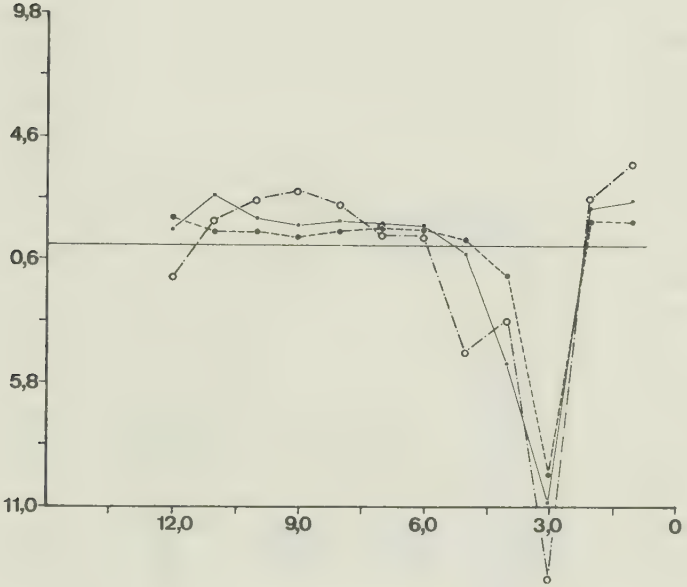


Abbildung 11

Graphische Darstellung der Computerauswertung der Polysomenprofile aus Mäuseembryonen am Tag 11 der Gestation und aus den zugehörigen mütterlichen Lebern.
Auf der Abszisse sind die Positionen der Aggregate von rechts nach links aufgetragen. Auf der Ordinate sind die Differenzen zwischen den Flächen der Peaks der Leberpolysomen (o—·—·—o), (●------●) und (■———■) und den embryonalen Polysomen (jeweils Bezugswert ≙ Nullinie) aufgetragen.

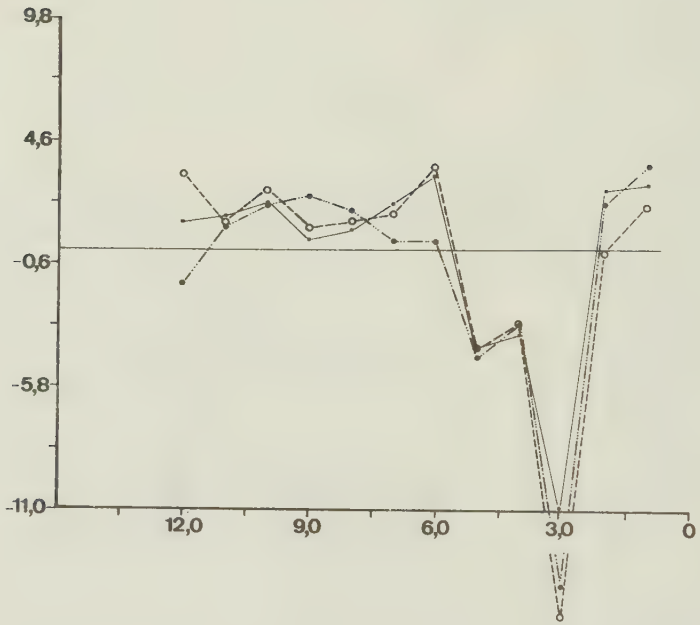


Abbildung 12

Graphische Darstellung der Computerauswertung der Polysomenprofile aus Mäuseembryonen am Tag 12 der Gestation und aus den zugehörigen mütterlichen Lebern. Auf der Abszisse sind die Positionen der Aggregate von rechts nach links aufgetragen. Auf der Ordinate sind die Differenzen zwischen den Flächen der Peaks der Leberpolysomen (o---o), (■———■) und (●—·—●) und den embryonalen Polysomen (jeweils Bezugswert = Nullinie) aufgetragen.

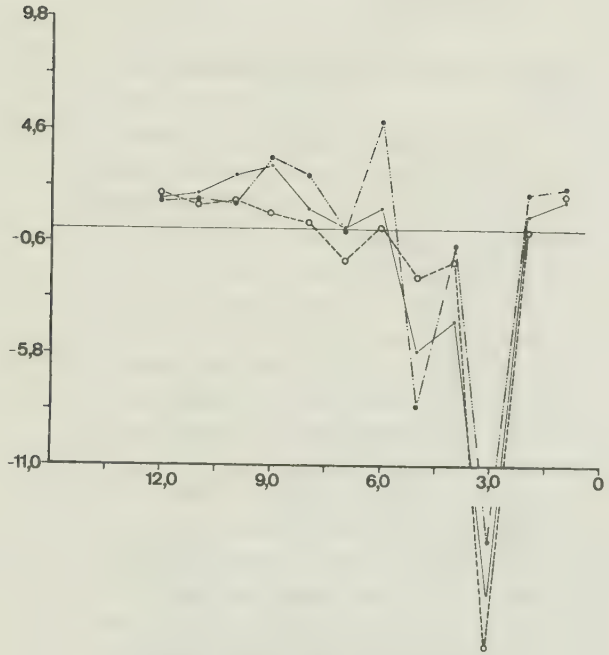


Abbildung 13

Graphische Darstellung der Computerauswertung der Polysomenprofile aus Mäuseembryonen am Tag 13 der Gestation und aus den zugehörigen mütterlichen Lebern. Auf der Abszisse sind die Positionen der Aggregate von rechts nach links aufgetragen. Auf der Ordinate sind die Differenzen zwischen den Flächen der Peaks der Leberpolysomen (o---o), (●·····●) und (■——■) und den embryonalen Polysomen (jeweils Bezugswert = Nullinie aufgetragen.

9. Hepatektomieversuche

9.1 Die Leber als regenerationsfähiges System

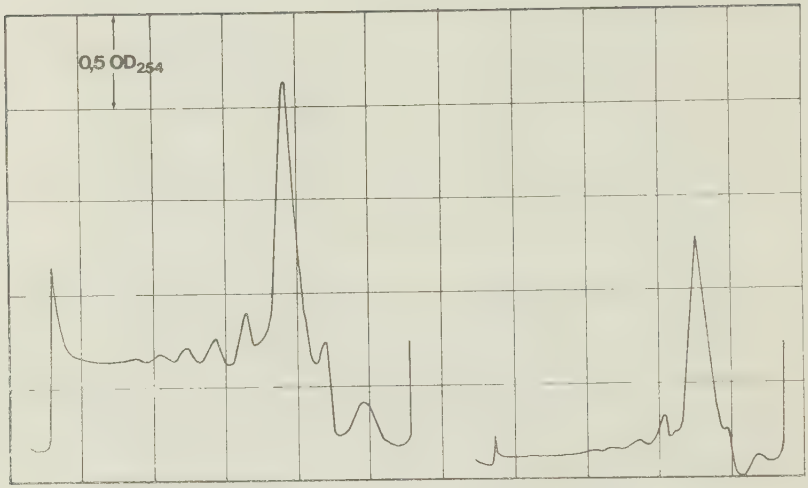
Bekanntlich verfügt die Leber der Ratte über die Fähigkeit, nach operativer Entfernung großer Teile dieses Organs, diese fehlenden Teile nachzubilden, sich also zu regenerieren. Während dieser Regenerationsphase geht die Leber von einem quasi-statischen in einen proliferierenden Zustand über. In den übriggebliebenen Leberzellen wird die DNA-Synthese stimuliert und die Zellen beginnen, sich zu teilen (BUCHNER 1963).
Der Initiationsmechanismus der DNA-Synthese ist noch nicht aufgeklärt; verschiedene Untersuchungen deuten auf einen humoralen Faktor, der nach partieller Hepatektomie in den Restzellen vorhanden zu sein scheint, und dem dieser Initiationseffekt zugeschrieben wird (PAUL 1972).
Untersuchungen von TSUKADA (1969) zeigen, daß die Serum-RNAse-Aktivität nach partieller Hepatektomie absinkt und niedriger als vorher ist, was auf einen Anstieg der RNAse-Inhibitor-Aktivität im Serum zurückgeführt wird. Eine Abnahme der Polysomenmenge im Profil nach partieller Hepatektomie könnte also nicht auf die Wirkung von RNAse während des Homo-

genisierens zurückgeführt werden.

9.2 Einfluß der partiellen Hepatektomie auf Leberpolysomenprofile

Nach dem oben Erwähnten kann man nach partieller Hepatektomie entweder einen Anstieg der schweren Polysomen oder im Gegenteil eine Zunahme an Monosomen erwarten je nachdem, ob die Abnahme der RNAse-Aktivität oder die Zunahme der DNA- und damit auch der mRNA-Synthese überwiegt. Um diese Frage zu klären, wurden weibliche nicht-trächtige Ratten einer partiellen Hepatektomie unterworfen, bei der rund 7o % der Leber entfernt wurden. Eine Kontrollgruppe wurde ebenfalls operiert und deren Lebern einer mechanischen Reizung ausgesetzt, ohne entfernt zu werden. Jeweils 24 h, 48 h und 72 h nach Operationsdurchführung wurden die Tiere getötet und aus den so isolierten Leberpolysomen Profile erstellt. Vierundzwanzig Stunden nach Durchführung der partiellen Hepatektomie nahm die Menge der Polysomen im Vergleich zur Kontrolle massiv ab, wobei auch die Absolutmenge der Ribosomen geringer als bei der Kontrolle war. Das Profil bestand praktisch nur noch aus Mono- und Disomen (siehe Abb. 14 b), während bei der Kontrolle Hexasomen und schwerere Aggregate zu beobachten waren.

Achtundvierzig Stunden nach dem Eingriff zeigte das Polysomenprofil erste Anzeichen einer Normalisierung. Die Menge der schwereren Aggregate nahm im Vergleich zum 24-Stunden-Versuch wieder zu, das Profil bestand nicht mehr ausschließlich aus Mono- und Disomen (siehe Abb. 14 c). Es bestand dennoch ein großer Unterschied zum Kontrollversuch, indem wesentlich weniger schwere Polysomen zu sehen waren als in jenem.
Nach 72 Stunden war das Polysomenprofil praktisch wieder unverändert. Es wies, wie das Kontrollprofil, das vollständige Verteilungsmuster auf, und auch die Mengenverteilung war wieder normal (siehe Abb. 14 d).
Diese Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit der oben erwähnten Stimulation der DNA- und damit auch der mRNA-Synthese infolge der partiellen Hepatektomie, die ebenfalls nach rund 72 Stunden wieder auf Normalniveau zurückgeht.
Interessant ist die Tatsache, daß die Erhöhung der RNAse-Inhibitor-Aktivität im Serum hier nicht zum Tragen gekommen ist, während sie normalerweise bei der Rattenleber von entscheidender Bedeutung war (siehe IV.4).



a b

Abbildung 14

Einfluß von partieller Hepatektomie auf Rattenleber-Polysomenprofile.
a) Profil auf unbehandelter Rattenleber (Kontrolle),
b) Leber-Polysomenprofile 24 Stunde nach partieller Hepatektomie.
Exponential-konvexer Saccharosegradient (3o % - 5o % w/w), Zentrifugationsdauer 165 min bei 4o ooo rpm im Spinco SW 41 Rotor.

Einfluß von partieller Hepatektomie auf Rattenleber-Polysomenprofile.
c) Leber-Polysomenprofile 48 Stunden und
d) 72 Stunden nach partieller Hepatektomie.
Exponential-konvexer Saccharosegradient (3o % - 5o % w/w), Zentrifugationsdauer 165 min bei 4o ooo rpm im Spinco SW 41 Rotor.

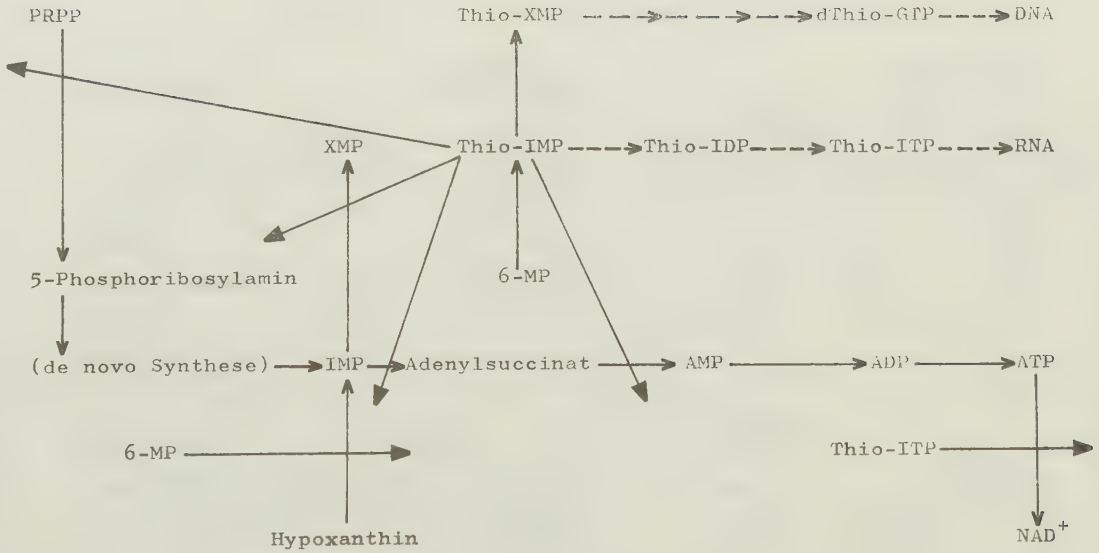
1o. Untersuchungen mit 6-Mercaptopurin

1o.1 Wirkungsmechanismus des 6-Mercaptopurins im Organismus

6-Mercaptopurin, von ELION, BURGI und HITCHINS (1952) synthetisiert, ist ein Hemmer der Nukleinsäuresynthese. Es wird als Cytostatikum bei der Tumor- und Leukämiebehandlung sowie als Immunsuppressivum eingesetzt.
Durch Reaktion mit der Guanin-Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase wird das 6-Mercaptopurin in seinen wirksamen Metaboliten Thioinosinsäure (Thio-IMP) umgewandelt. Dieser Metabolit hemmt in-vivo vorwiegend diejenigen Reaktionen, die von der Phosphoribosylpyrophospatamidotransferase (Umwandlung von Phosphoribosylpyrophosphat PRPP in Phosphoribosylamin), der Adenylsuccinatsynthetase (Umwandlung von Inosinsäure IMP in Succinyladenylsäure SAMP) und der Inosinsäure-Dehydrogenase (Umwandlung der Inosinsäure IMP in die Xantinsäure XMP) katalysiert werden. (Siehe Schema 1 und 2)
Das 6-Mercaptopurin bzw. sein aktiver Metabolit Thio-IMP greifen also an verschiedenen Stellen der Purinsynthese ein und vermögen so die Nukleinsäuresynthese zu hemmen.

Schema 1

Zusammenfassende Übersicht der Purinbiosynthese bis zur Bildung von Inosinmonophosphat (aus: Die Nukleinsäuren von HARBERS E., Thieme-Verlag, Stuttgart, 1969)



Schema 2

Metabolismus des 6-Mercaptopurins. Pfeile mit ▶ zeigen bekannte Angriffsstellen des 6-MP, während Pfeile mit gebrochener Linie Reaktionen Anzeigen, die noch nicht endgültig bewiesen wurden. Nach P. Roy - Burman, Analogues of Nucleic Acid Components, Recent Results in Cancer Research, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1970

1o.2 Teratogene Eigenschaften des 6-Mercaptopurins

Neben der therapeutischen Wirksamkeit besitzt das 6-Mercaptopurin auch ausgeprägte teratogene Eigenschaften (TUCHMANN-DUPLESSIS und MERCIER-PAROT 1959).

MURPHY (196o) erhielt bei der Behandlung trächtiger Ratten eine rund 9o%ige Resorptionsquote, wenn sie den Muttertieren am 12. Tag der Gestation 6o - 12o mg/kg 6-Mercaptopurin (rund 1/4 bis 1/2 der LD_{5o} der Muttertiere) applizierte. Eine Dosis von nur 1,25 mg/kg, täglich vom Tag 6 bis Tag 12 der Trächtigkeit an Ratten appliziert, führte zu 1oo%iger Resorption aller Embryonen.

KURY et al. (1963) fanden bei Verabreichung von 6-Mercaptopurin an Ratten am 11. Tag der Trächtigkeit, daß die Hälfte der LD_{5o} der Muttertiere bereits die LD_{1oo} der Foeten ist, und daß die optimale Dosis zur Erzielung teratogener Schäden rund 6o mg/kg beträgt. Eine einmalige Applikation dieser Dosis am 11. Tag der Gestation führte zu Mißbildungen wie Gaumenspalten, Deformationen der Extremitäten und Anomalien des Urogenitaltraktes.

1o.3 Einfluß von 6-Mercaptopurin auf Polysomenprofile von Rattenembryonen am Tag 12 der Gestation

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte unter anderem untersucht werden, ob die invivo Applikation von teratogenen Dosen

6-Mercaptopurin Veränderungen im Polysomenprofil von Rattenembryonen hervorruft.
Zur Klärung dieser Frage wurden Versuche wie folgt durchgeführt:
Am Tag 12 der Trächtigkeit wurden Ratten intraperitoneal o,5 ml einer 6-Mercaptopurin (6-MP) haltigen Propylenglykollösung appliziert. Die Kontrolltiere erhielten o,5 ml des reinen Lösungsmittels pro 2oo g Körpergewicht. Nach der festgelegten Einwirkungsdauer wurden die Ratten getötet, die Embryonen herauspräpariert und aus diesen Polysomen isoliert. Die anschließend erstellten Polysomenprofile wurden mit dem CDC 72oo Computer quantifiziert und die Ergebnisse auf Effekte des 6-Mercaptopurins untersucht. Leider mußte die narkotisierende Wirkung des Propylenglykols in Kauf genommen werden, da das 6-Mercaptopurin sich nicht in physiologischer Kochsalzlösung oder ähnlich harmlosen Lösungsmitteln löst.
Die in der Therapie gebräuchliche Suspension wurde ebenfalls nicht verwendet, da durch die Sedimentation der Substanz die Dosierung zu fehlerhaft geworden wäre.

Folgende Dosen und Wirkungsdauern wurden untersucht:

1. Zwei Dosen von je 25 mg/kg im Abstand von 3 Stunden, untersucht 3 Stunden nach Applikation der zweiten Dosis.

2. 5o mg/kg; 1 1/2, 3 und 6 Stunden.

1o.3.1 Einwirkung von 2 x 25 mg/kg 6-MP im Abstand von 3 Stunden

Ratten wurden am Tag 12 der Trächtigkeit zwei Dosen von je 25 mg/kg 6-MP im Abstand von 3 Stunden intraperitoneal appliziert.
Drei Stunden nach Verabreichung der zweiten Dosis wurden die Tiere getötet und aus den embryonalen Polysomen Profile erstellt.
Der quantitative Vergleich dieser Profile mit Kontrollprofilen zeigte eine Veränderung, die auf die Wirkung des 6-Mercaptopurins zurückgeführt werden mußte. Es war eine Zunahme schwererer Aggregate auf Kosten der Monosomen im Vergleich zu den Kontrollwerten zu beobachten.
Während die Menge der Monosomen um 4o % abnahm, nahm die Polysomenmenge um rund 25 % bis 4o % pro korrespondierendem Peak zu (siehe Tabelle 13 und Abb. 15). Die stärkste Zunahme war im Bereich der Trisomen mit 112 % zu beobachten, während die übrigen Aggregate um 3o % bis 5o % zunahmen.

1o.3.2 Einwirkung von 5o mg/kg 6-MP für die Dauer von 1 1/2 Stunden

Bei der Applikation von 5o mg/kg für die

Dauer von 1 1/2 Stunden konnten keine signifikanten Veränderungen im Polysomenprofil der behandelten Rattenembryonen entdeckt werden.
Die Mengen der einzelnen polysomalen Aggregate bewegten sich im Schwankungsbereich der Kontrollwerte (siehe Tabelle 13 und Abb. 15).
Da weitere Versuche mit der gleichen Dosis, jedoch längerer Einwirkungsdauer, Veränderungen im Polysomenprofil zeigten, muß angenommen werden, daß die Einwirkungsdauer von 1 1/2 Stunden zu kurz bemessen war.

1o.3.3 Einwirkung von 5o mg/kg 6-MP für die Dauer von 3 Stunden

Aufgrund der anscheinend zu kurzen Einwirkungsdauer von 1 1/2 Stunden wurden erneut 5o mg/kg 6-MP appliziert, wobei die Einwirkzeit auf 3 Stunden verlängert wurde. Diesmal konnten tatsächlich signifikante Veränderungen im Polysomenprofil der behandelten Rattenembryonen beobachtet werden. Auch hier, wie bei der Applikation von 2 x 25 mg/kg im Abstand von 3 Stunden (siehe 1o.3.1) war eine Abnahme der Monosomen und eine Zunahme der schwereren Polysomen zu beobachten. Während die Menge der Monosomen um 26 % im Vergleich zur Kontrolle abnahm, nahm die Menge der Polysomen um ca. 3o % bis

6o % pro Aggregat zu. Die stärkste Zunahme wiesen auch hier die Trisomen mit 122 % auf (siehe Tabelle 13 und Abb. 16).

1o.3.4 Einwirkung von 5o mg/kg 6MP für die Dauer von 6 Stunden

Bei der Applikation für die Dauer von 6 Stunden nahmen die bereits unter 1o.3.1 und 1o.3.3 beschriebenen Effekte dramatische Ausmaße an.
Im Vergleich zur Kontrolle nahm die Menge der Subunits, der Mono- und der Disomen um 5o % bis 7o % ab. Die Menge der Tri- und Tetrasomen nahm um 36 % bzw. um 17 % zu.
Im Bereich der noch schwereren Polysomen war der Effekt am ausgeprägtesten. Dort stieg der Mengenzuwachs pro Peak auf über 1oo % an und erreichte bei den Nona- und Dekasomen Spitzenwerte von 254 % bzw. 26o % (siehe Tabelle 13 und Abb. 16).

1o.3.5 Zusammenfassende Diskussion der 6-MP Versuche

Es zeigte sich in den oben beschriebenen Versuchen, daß bei der Applikation teratogener Dosen von 6-Mercaptopurin an trächtigen Ratten am Tag 12 der Gestation typische Veränderungen am Polysomenprofil der behandelten Embryonen zu beobachten waren, und zwar zeit- und dosisabhängig.

Da die Applikation von 5o mg/kg für die Dauer von 1 1/2 Stunden keine Veränderungen im Polysomenprofil zeigte, während die gleiche Dosis nach 3 Stunden deutliche Effekte zeigte, muß angenommen werden, daß die Resorption des 6-Mercaptopurins, seine Metabolisierung zum aktiven Thio-IMP und die vom letzteren bewirkte Hemmung der Nukleinsäuresynthese länger als 1 1/2 Stunden, jedoch weniger als 3 Stunden dauert. Weiterhin ist interessant, daß der bei der Applikation von 2 x 25 mg/kg im Abstand von drei Stunden aufgetretene Effekt dem durch die Applikation von 5o mg/kg für die Dauer von 3 Stunden hervorgerufenen Effekt in Größe und Tendenz ähnelt (siehe Tabelle 13 und Abb. 15 und 16).
Wie bereits in Kapitel 1.5 ausführlicher beschrieben, fanden SCHREIER und STAEHELIN (1973), daß bei der Titration von Ribosomen mit mRNA bei steigendem Mengenverhältnis von mRNA zu Ribosomen eine Verschiebung in Richtung Monosomen stattfindet, während bei Verknappung der mRNA-Menge eine Verschiebung in Richtung Polysomen zu beobachten ist.

Unter diesem Aspekt gesehen, könnte die in den oben beschriebenen Versuchen beobachtete Verschiebung in Richtung schwererer Polysomen unter Einfluß von

6-Mercaptopurin als Verarmung der embryonalen Zellen an mRNA infolge der Wirkung dieses Pharmakons angesehen werden. Dabei dürfte es sich um einen recht komplexen Vorgang handeln, der zwei bis drei Stunden in Anspruch nimmt.
Als erstes wird das in die Bauchhöhle der Muttertiere injizierte 6-MP resorbiert und an den Wirkungsort seiner Metabolisierung transportiert. Dort unterliegt das resorbierte 6-MP einer biochemischen Umwandlung zum aktiven Metaboliten Thio-IMP.
Dort dürfte das Thio-IMP, ähnlich wie im adulten Organismus, die Purinsynthese und damit die mRNA-Synthese hemmen. Diese Hemmung, die sich in der Akkumulation schwererer Polysomen im Profil der behandelten Embryonen manifestiert, dürfte direkt und indirekt für die von den verschiedenen Arbeitsgruppen gefundenen Resorptionen und Mißbildungen verantwortlich sein.
Eine genügend lange Hemmung der mRNA-Synthese würde zur Hemmung der Synthese ribosomaler Proteine und zu funktionsunfähigen Ribosomen führen. Ferner könnte die Bildung von Enzymen und Strukturproteinen behindert und dadurch schwere Schädigungen des Embryos verursacht werden.
Unserem Wissen nach ist im Rahmen dieser

Arbeit zum ersten Mal gezeigt worden, daß ein teratogenes Pharmakon pathologische Veränderungen im Polysomenprofil bewirkt.
Die Bedeutung dieser Befunde liegt wohl darin, daß mit Hilfe der Erstellung von Polysomenprofilen eine schnelle und mit geringem Materialaufwand durchzuführende Unterscheidung zwischen den verschiedenen Angriffspunkten des 6-Mercaptopurins in den Bereich des Möglichen rückt.

Die Hemmung der mRNA-Synthese läßt sich am Polysomenprofil zeigen, während die Hemmung der Synthese der ribosomalen bzw. tRNA keine Veränderungen im Polysomenprofil bewirken dürfen.
Weitere noch detailliertere Aufschlüsse werden in Zukunft durch Untersuchungen an Polysomenprofilen aus spezifischen Embryo-Organen gewonnen werden können, wobei die Effekte ausgeprägter und damit leichter zu entdecken sein werden. So dürften z.B. Effekte des 6-Mercaptopurins, die zu Extremitätendeformierungen führen, am besten an Profilen von Polysomen aus embryonalen Extremitätenknospen sichtbar gemacht werden können, da diese Effekte nicht durch die Verwendung ganzer Embryonen "verdünnt" würden.

RE_{12}-Ko	RE_{12}-6 MP a	Δ[%]	RE_{12}-6MP b	Δ[%]	RE_{12}-6MP c	Δ[%]	RE_{12}-6MP d	Δ[%]
1,7	o,9	- 47%	2,5	+ 47%	o,7	- 59%	1,9	+ 12%
1,7	3,1	+ 82%	1,9	+ 12%	o,7	- 59%	1,4	- 17%
16,4	14,8	- 1o%	12,2	- 26%	7,3	- 55%	9,9	- 4o%
3,4	5,4	+ 59%	7,6	+ 124%	4,2	+ 24%	1o,2	+ 2oo%
15,6	12,3	- 21%	16,9	+ 8%	4,3	- 72%	2o,3	+ 3o%
5,8	7,2	+ 24%	13,o	+ 122%	7,9	+ 36%	12,3	+ 112%
8,1	7,o	- 14%	8,9	+ 1o%	9,5	+ 17%	9,7	+ 2o%
5,9	5,7	- 3%	7,8	+ 32%	11,4	+ 93%	7,8	+ 32%
5,6	5,7	+ 2%	7,8	+ 39%	11,2	+ 1oo%	7,2	+ 29%
5,o	5,1	+ 2%	8,1	+ 62%	11,3	+ 126%	6,1	+ 22%
3,8	3,9	+ 3%	5,9	+ 55%	1o,5	+ 176%	4,9	+ 29%
2,4	2,9	+ 21%	3,8	+ 58%	8,5	+ 254%	3,6	+ 5o%
1,5	1,1	- 27%	2,o	+ 33%	5,4	+ 26o%	1,9	+ 27%

Ko = Kontrolle

Tabelle 13

Einfluß von 6-MP auf die Polysomenprofile von Rattenembryonen am Tag 12 der Gestation.

Angegeben sind die Flächenwerte der einzelnen korrespondierenden Peaks als Prozentangaben der Gesamtflächen der Profile. RE_{12}-Ko bedeutet Rattenembryonen am Tag 12 der Gestation als Kontrolle, a entspricht der Applikation von 5o mg/kg 6-MP für 1 1/2 Stunden, b der Applikation von 5o mg/kg 6-MP für 3 Stunden, c der Applikation von 5o mg/kg 6-MP für 6 Stunden, d entspricht der Applikation zweier Dosen von je 25 mg/kg 6-MP im Abstand von 3 Stunden und der Untersuchung 3 Stunden nach Verabreichung der zweiten Dosis. Es werden weiter die Differenzen zwischen den korrespondierenden Flächen in % der Kontrollwerte (Δ%), die Mittelwerte $\overline{X}$ der Δ%-Werte und die zugehörigen Standardabweichungen σ angegeben.

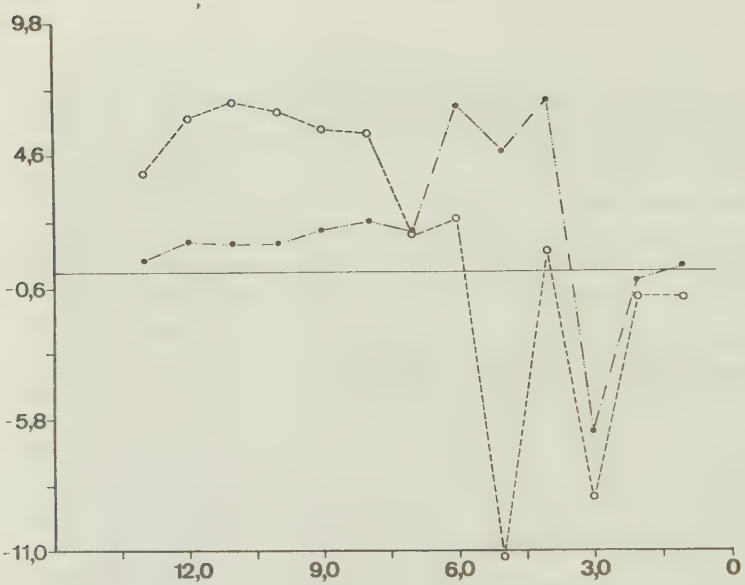


Abbildung 15

Graphische Darstellung der Computerauswertung der Polysomenprofile aus Mäuseembryonen am Tag 12 der Gestation nach Behandlung mit zwei Dosen von je 25 mg/kg 6-Mercaptopurin im Abstand von 3 Stunden (● ---- ●) und Behandlung mit 5o mg/kg 6-MP für die Dauer von 6 Stunden (o---o) im Vergleich zur Kontrolle (Bezugswert = Nullinie).
Auf der Abszisse sind die Positionen der Aggregate von rechts nach links aufgetragen. Auf der Ordinate sind die Flächendifferenzen zwischen den korrespondierenden Peaks der behandelten Tiere und der Kontrolltiere aufgetragen.

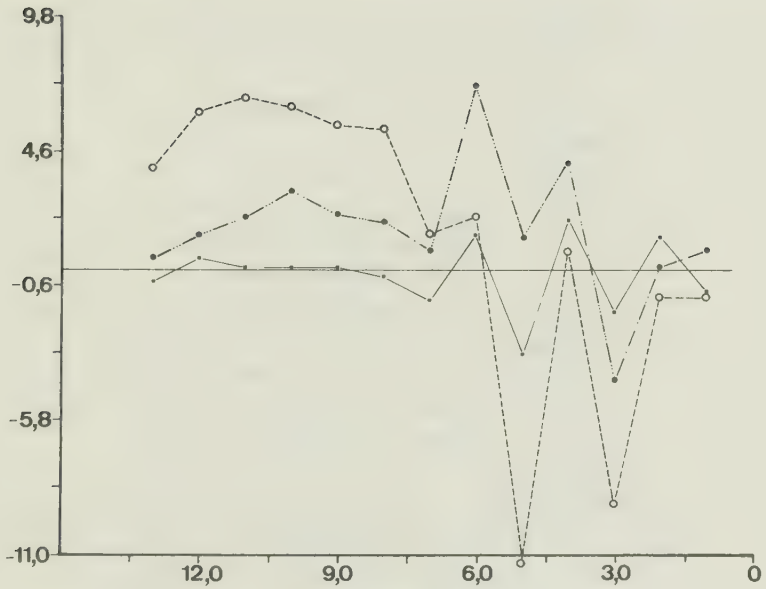


Abbildung 16

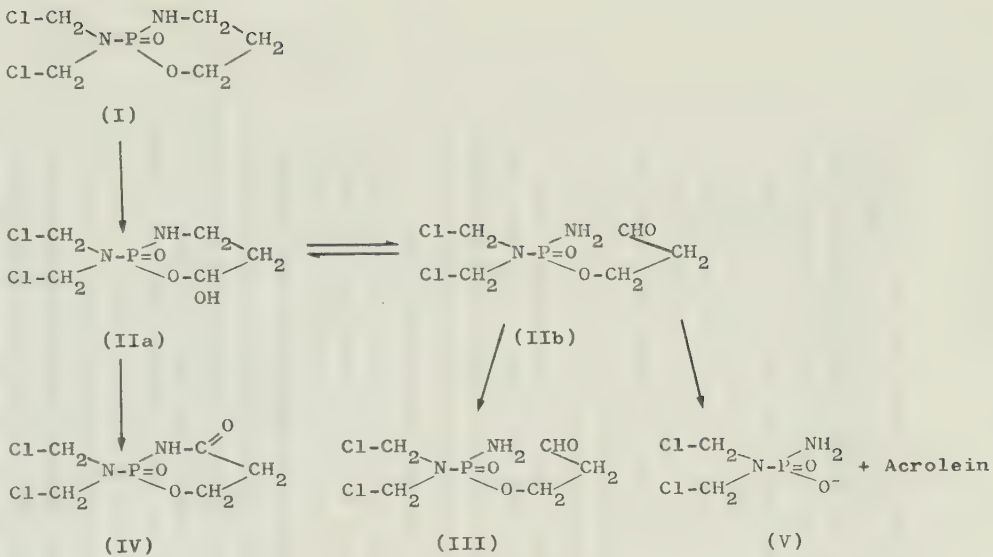
Graphische Darstellung der Computerauswertung der Polysomenprofile aus Rattenembryonen am Tag 12 der Gestation nach Behandlung mit 5o mg/kg 6-Mercaptopurin für die Dauer von 1 1/2 Stunden (■——■), 3 Stunden (●——●) und 6 Stunden (o---o) im Vergleich zur Kontrolle (Bezugswert = Nullinie).
Auf der Abszisse sind die Positionen der Aggregate von rechts nach links aufgetragen. Auf der Ordinate sind die Flächendifferenzen zwischen den korrespondierenden Peaks der Versuche und der Kontrollen aufgetragen.

11. Untersuchungen mit Cyclophosphamid (Endoxan^{R})

11.1 Wirkungsmechanismus des Endoxans im Organismus

Endoxan (N,N-Bis-(2-chloräthyl)-N, O-propylenphosphorsäureesterdiamid), das in der Tumortherapie (BOESEN und DAVIS 1969) verwendet wird, zählt zu den N-Lost-Derivaten und damit zu den alkylierenden Substanzen. Es ist in-vitro nicht cytotoxisch, sondern wird erst im Organismus, vermutlich durch Einwirkung der in den Lebermikrosomen lokalisierten "mixed function oxydases" oxydativ aktiviert.
Neueste Untersuchungen (CONNORS et al. 1974) schlagen folgendes Metabolisierungs- und Aktivierungsschema vor (siehe Schema 3):

1. Oxydation des Endoxans (I) durch die "mixed function oxydases" zum 4-Hydroxycyclophosphamid (IIa), das im Gleichgewicht mit seiner acyclisch-tautomeren Form Aldophosphamid (IIb) steht.
2. Aus Aldophosphamid (IIb) entsteht durch enzymatische Reaktionen das Carboxyphosphamid (III).
3. Aus Aldophosphamid (IIb) entstehen ferner Phosphoramid-Lost (V) und Acrolein.



Schema 3

Metabolische Aktivierung des Cyclophosphamids (CONNORS et al. 1974)

4. Aus 4-Hydroxycyclophosphamid (IIa) entsteht durch enzymatische Reaktionen das 4-Ketocyclophosphamid (IV).

Als cytotoxisch erwiesen sich die Verbindungen (V) und Acrolein. Im Gegensatz zu früheren Annahmen war jedoch nicht das Acrolein die toxische Hauptkomponente, sondern der Phosphoramid-Lost (V), der rund 7mal toxischer als das Acrolein war.

Im Organismus bewirkt Endoxan eine Alkylierung der Nukleinsäuren, hauptsächlich der DNA. Dabei werden besonders häufig die N-7-Position des Guanins und die N-3-Position des Adenins alkyliert (BROOKES und LAWLEY 1964).

Durch diese Alkylierungen können verschiedene Effekte verursacht werden:

1. Es treten Verschiebungen der Bindungselektronendichte auf, wodurch eine Bindungslockerung zwischen der Base und dem Zuckerrest bewirkt wird. Die betroffene Base kann dann leicht aus der Nukleinsäure entfernt werden, was zu Mutationen führt.
2. Aktive Gruppen des alkylierenden Agens können kovalent an die Base gebunden werden, was zu Ablesefehlern bei der Transkription führen würde.
3. Die Grundstruktur der gesamten Nukleinsäure kann labilisiert werden, was

zu Kettenbrüchen führen würde.

4. Durch Vernetzung der DNA-Stränge über Methylenbrücken wird die Entspiralisierung des DNA-Doppelstranges verhindert, wodurch die Replikation und damit auch die Transkription unterbunden werden.

11.2 Teratogene Eigenschaften des Cyclophosphamids

Jeder der oben beschriebenen Effekte kann direkt oder indirekt über die Zwischenstufen von unwirksamen Enzymen oder falschen Gerüstproteinen zu Mißbildungen in einem sich in der Entwicklungs- und Differenzierungsphase befindlichen Embryo führen.
CHAUBE et al. (1967) konnten tatsächlich zeigen, daß Rattenembryonen, deren Muttertieren in den Tagen 11 und 12 der Gestation nur 7 - 1o mg/kg Endoxan appliziert wurden, Skelettdefekte, Gaumenspalten und andere Mißbildungen aufwiesen.
VON KREYBIG (1965) zeigte, daß die optimale teratogene Dosis bei Ratten 1o - 2o mg/kg beträgt.

11.3 Einfluß von Cyclophosphamid auf Polysomenprofile von Rattenembryonen in den Tagen 12 und 14 der Gestation

Aufgrund der bekannten teratogenen

Eigenschaften des Endoxans war es naheliegend zu untersuchen, ob dieses Pharmakon nach Applikation Veränderungen im embryonalen Polysomenprofil verursacht.
Daher wurden Ratten an den Tagen 12 bzw. 14 der Gestation jeweils 1o mg/kg Cyclophosphamid, gelöst in 5 ml einer o,9%igen Kochsalzlösung, intraperitoneal appliziert. Anderthalb bzw. drei Stunden nach Applikation wurden die Ratten getötet und aus den gewonnenen Embryonen Polysomen isoliert. Die erstellten Profile wurden durch einen Computer quantitativ analysiert und die so erhaltenen Werte für die Flächen unter den einzelnen korrespondierenden Peaks mit denen von Kontrollen verglichen, die lediglich 1 ml o,9%iger Kochsalzlösung intraperitoneal erhielten.

11.3.1 Einwirkung von 1o mg/kg Endoxan am Tag 12 der Gestation für die Dauer von 1 1/2 Stunden

Der Vergleich der Profile aus behandelten und unbehandelten Ratten 1 1/2 Stunden nach der Applikation von 1o mg/kg Endoxan zeigt keinerlei signifikante Unterschiede in der Mengenverteilung der einzelnen Aggregate (siehe Abb. 17 und Tabelle 14).

11.3.2 Einwirkung von 1o mg/kg Endoxan am Tag 12 der Gestation für die Dauer von 3 Stunden

Drei Stunden nach der Applikation von 1o mg/kg Endoxan konnte in den Profilen der behandelten Embryonen eine sehr starke Zunahme an Untereinheiten und Monosomen beobachtet werden. Die Menge der 4o S Subunit nahm um 2oo %, die der 6o S Subunit um 19o % und die der Monosomen gar um 28o % im Vergleich zum Kontrollwert zu (siehe Abbildung 17 und Tabelle 14).
Die Menge der schwereren Aggregate nahm dagegen um 15%-27% ab. Da die Zunahme der Subunits und Monosomen auf Kosten aller anderen Aggregate ging, ist es nicht verwunderlich, daß die Einzelabnahmen, für sich betrachtet, nicht signifikant sind. Ob die beobachtete Verschiebung in Richtung Monosomen und Subunits auf eine Aktivierung der RNAsen, eine Deaktivierung der RNAse-Inhibitoren oder auf eine zeitweilige Anreicherung des embryonalen Zellsystems an mRNA (aufgrund der erwarteten Wirkung des Endoxans recht unwahrscheinlich) zurückzuführen war, konnte nicht bestimmt werden.
Dazu müssen weitere Experimente durchgeführt werden, wie z.B. Messung der RNAse-Aktivität bzw. der RNAse-Inhibitor-

Aktivität nach Cyclophosphamid-Applikation und der Zusatz von tRNA zum Homogenisierungsmedium, um zu beobachten, ob dadurch die Verschiebung in Richtung Monosomen aufhebbar ist.

11.3.3 Einwirkung von 1o mg/kg Endoxan am Tag 14 der Gestation für die Dauer von 1 1/2 Stunden bzw. 3 Stunden

Die Applikation von 1o mg/kg Endoxan am Tag 14 der Gestation erbrachte weder nach 1 1/2 noch nach 3 Stunden irgendwelche Veränderungen im Polysomenprofil der behandelten Embryonen (siehe Tabelle 15 und Abbildung 1o). Da am Tag 12 der Gestation drei Stunden nach Applikation der gleichen Menge Endoxan ein Effekt zu beobachten war, muß daraus geschlossen werden, daß die Empfindlichkeit der Rattenembryonen gegenüber Endoxan vom Tag 12 zum Tag 14 der Gestation abnimmt.
Tatsächlich deuten die Versuche von CHAUBE et al. (1965) auf diesen Sachverhalt hin.

RE_{12}-Ko	RE_{12}-End. a	△ [%]	RE_{12}-Ko	RE_{12}-End. b	△ [%]
2,6	2,2	- 15,4 %	o,9	2,7	+ 2oo,o %
2,9	1,7	- 41,4 %	1,o	2,9	+ 19o,o %
15,2	15,1	- o,6 %	4,5	17,1	+ 28o,o %
5,1	6,2	+ 21,6 %	6,o	6,2	+ 3,3 %
1o,5	1o,6	+ 1,o %	12,o	1o,1	- 15,8 %
7,7	8,4	+ 9,1 %	6,8	6,2	- 8,8 %
6,4	6,2	- 3,1 %	5,8	4,9	- 15,5 %
5,6	5,7	+ 1,8 %	5,9	5,o	- 15,3 %
4,8	5,6	+ 16,7 %	6,o	4,7	- 21,7 %
5,5	6,5	+ 18,2 %	5,3	6,7	+ 26,4 %
3,8	3,7	- 2,6 %	5,1	3,7	- 27,5 %
2,6	2,1	- 19,2 %	3,o	2,4	- 2o,o %

Tabelle 14

Einfluß von 1o mg/kg Endoxan auf Polysomenprofile von Rattenembryonen am Tag 12 der Gestation.

Angegeben werden die Flächenwerte der einzelnen korrespondierenden Peaks als Prozentangaben der Flächen der Profile, ferner die Flächendifferenzen zwischen Versuchs- und Kontrollpeaks in Prozent der Kontrollpeaks (△ %). RE_{12}-Ko steht für unbehandelte Kontrollembryonen am Tag 12 der Gestation, RE_{12}-End. a für Rattenembryonen am Tag 12 der Gestation, die mit 1o mg/kg Endoxan für die Dauer von 1 1/2 Stunden behandelt wurden und RE_{12}-End. b für solche, die für die Dauer von 3 Stunden behandelt wurden.

RE_{14}-Ko	RE_{14_a}-End.	Δ [%]	RE_{14}-Ko	RE_{14_b}-End.	Δ [%]
4,7	2,2	- 53 %	1,5	2,o	+ 33 %
3,5	3,5	± o %	1,5	1,2	- 2o %
12,o	12,1	- 1 %	1o,6	9,3	- 12 %
1o,1	12,7	+ 26 %	6,3	5,1	- 19 %
11,8	1o,4	- 12 %	16,4	17,5	+ 7 %
1o,9	11,1	+ 2 %	11,9	12,2	+ 3 %
9,6	9,4	- 2 %	1o,2	9,3	- 9 %
8,4	9,6	+ 14 %	7,9	8,2	+ 4 %
8,5	7,5	- 12 %	7,5	7,6	+ 1 %
6,1	6,o	- 2 %	6,4	6,3	- 2 %
4,6	4,8	+ 4 %	5,1	5,1	± o %
5,6	5,1	- 9 %	7,7	7,o	- 4 %

Tabelle 15

Einfluß von 1o mg/kg Endoxan auf Polysomenprofile von Rattenembryonen am Tag 14 der Gestation.

Angegeben werden die Flächenwerte der einzelnen korrespondierenden Peaks als Prozentangaben der Flächen der Profile, ferner die Flächendifferenzen zwischen Kontroll- und Versuchspeaks in Prozent der Kontrollpeaks (Δ %). RE_{14}-Ko steht für unbehandelte Kontrollembryonen am Tag 14 der Gestation, RE_{14}-End. a für Rattenembryonen am Tag 14 der Gestation nach Behandlung mit 1o mg/kg Endoxan für die Dauer von 1 1/2 Stunden und RE_{14}-End. b für solche, die für die Dauer von 3 Stunden behandelt wurden.

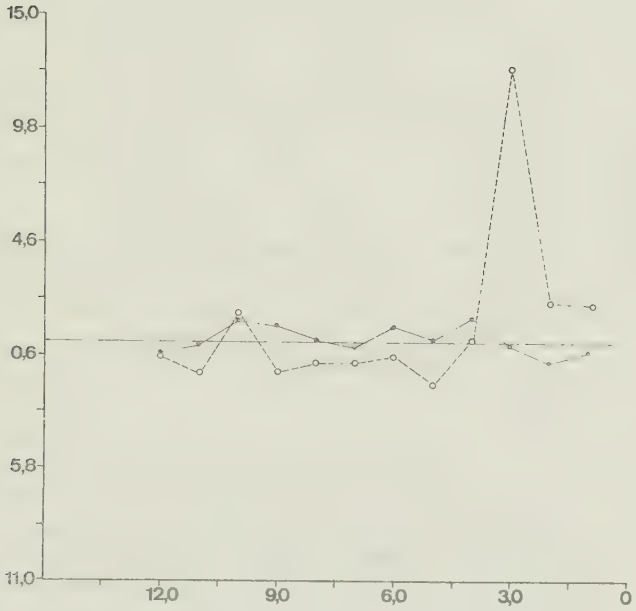


Abbildung 17
Graphische Darstellung der Computerauswertung der Polysomenprofile aus Rattenembryonen am Tag 12 der Gestation, nach Behandlung mit 1o mg/kg Endoxan für die Dauer von 1 1/2 Stunden (o—··—o) bzw. 3 Stunden (o---o) und von unbehandelten Embryonen (Bezugswert = Nullinie)
Auf der Abszisse sind die Positionen der Aggregate von rechts nach links aufgetragen. Auf der Ordinate sind die Flächendifferenzen zwischen den korrespondierenden Peaks der Versuche und der Kontrollen aufgetragen.

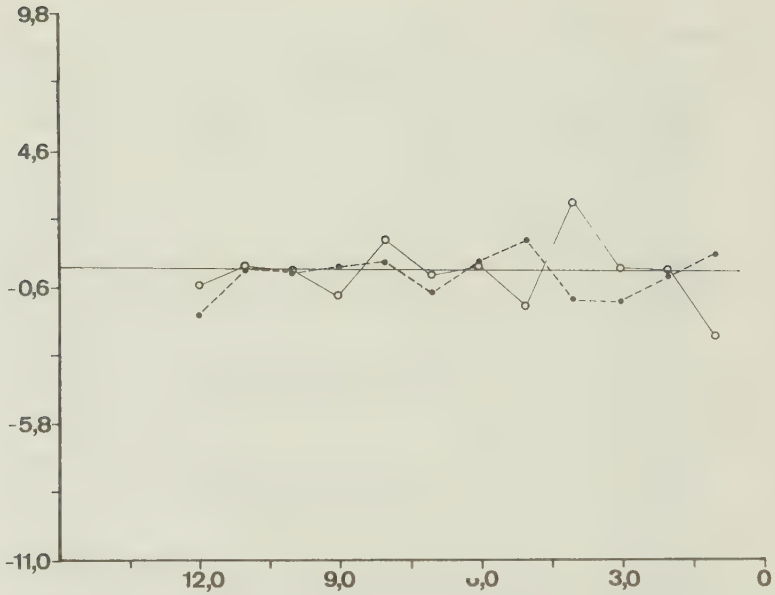


Abbildung 18

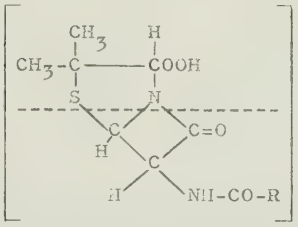
Graphische Darstellung der Computerauswertung der Polysomenprofile aus Rattenembryonen am Tag 14 der Gestation nach Behandlung mit 1o mg/kg Endoxan für die Dauer von 1 1/2 Stunden (o——o) bzw. 3 Stunden (•---•) im Vergleich zu den Profilen unbehandelter Embryonen (Bezugswert = Nullwert).
Auf der Abszisse sind die Positionen der Aggregate von rechts nach links aufgetragen. Auf der Ordinate sind die Flächendifferenzen zwischen den korrespondierenden Peaks der Versuche und der Kontrollen aufgetragen.

12. Untersuchungen mit D-Penicillamin

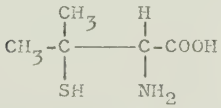
12.1 Chemische Eigenschaften und biologische Wirkung des D-Penicillamins

Im Jahre 1943 entdeckten ABRAHAM, CHAIN, BAKER und ROBINSON das Penicillamin als gemeinsames Spaltprodukt aller Penicilline.

Penicillin



Sie stellten fest, daß es sich beim Penicillamin um eine bis dahin unbekannte -Aminosäure der unnatürlichen D-Reihe, nämlich um D-Thiovalin bzw. D-Dimethylcystein handelte und konnten dies durch Synthese nachweisen (CLARK, JOHNSON und ROBINSON 1949):

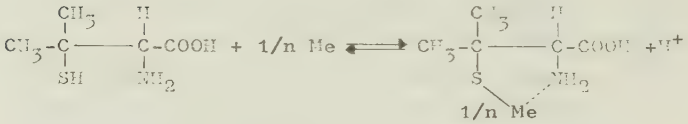


D-Penicillamin

12.1.1 Chelatbildung

Penicillamin kann aufgrund seiner räumlichen Struktur und der freien Elektronenpaare der Sulfhydryl-, Amino- und Carboxyl-

gruppe mit Schwermetallkationen zwei- und dreiwertige Chelate bilden:

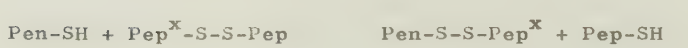


(Me = Pb, Cd, Zn, Cu, Ni, Hg, Co, Au, n = 1 und 2)

Es wird daher bei Schwermetallvergiftungen als Antidot eingesetzt (KUSCHINSKAS 1962).
Darüber hinaus hat es sich bei der Behandlung des Morbus Wilson (einer Kupferspeicherungskrankheit) bewährt.

12.1.2 Depolymerisationseigenschaften

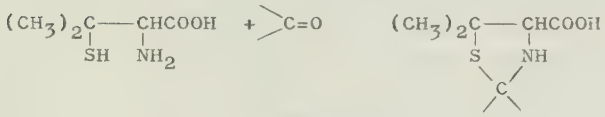
Aufgrund der freien, zur Disulfidbildung fähigen Sulfhydrylgruppe vermag das Penicillamin Disulfidbrücken zwischen Peptidketten unter Bildung eines Penicillamin-Peptid-Adduktes zu spalten:



Diese Wirkung wird z.B. als Erklärung dafür angeführt, daß ein pathologisches Protein, der "Rheumafaktor", unter Penicillamintherapie im Serum nur noch in Form seiner Untereinheiten nachweisbar ist (SCHNEIDER 1967).

12.1.3 Thiazolidinring-Bildung

Penicillamin kondensiert glatt mit Carbonylverbindungen zu Thiazolidinen:



So reagiert z.B. Penicillamin mit Vitamin B_6 (Pyridoxalphosphat) (HASENBANK 1968) sowie mit den freien Carbonylgruppen des Protokollagens (NIMNI 1965) unter Thiazolidinring-Bildung.
Die zweite Reaktion verhindert die Quervernetzung des Protokollagens zum Kollagen, wodurch ein pathologisches Bindegewebe induziert wird.

12.2 Möglichkeiten der Einwirkung von D-Penicillamin auf die Proteinbiosynthese und auf die Polysomenprofile

Aufgrund der oben beschriebenen Eigenschaften des Penicillamins sind verschiedene Angriffsmöglichkeiten während der embryonalen Entwicklung denkbar.
Die Chelatbildungsfähigkeit des Penicillamins könnte z.B. zur Abnahme der Mg^{2+}-Ionenkonzentration führen, wodurch die Ribosomen in ihre Untereinheiten zerfallen würden.
Dies wiederum würde zur Abnahme der Proteinsynthesekapazität gerade zu dem

Zeitpunkt führen, zu dem eine maximale Syntheseleistung nötig wäre. Das so induzierte Fehlen absolut notwendiger Enzyme würde zu schweren Schädigungen des sich entwickelnden Embryos und sogar zu seinem Absterben führen. Da auch bestimmte Polymerasen Mg^{2+}-abhängig sind, könnte die Abnahme der Mg^{2+}-Konzentration und die damit verbundene, teilweise inaktivierende Wirkung auf die Polymerasen zu einer Hemmung der RNA bzw. mRNA-Synthese führen. Auch dadurch würde ein Fehlen von Enzymen und Strukturproteinen mit allen daraus folgenden und oben erwähnten Folgen induziert werden.
Die depolymerisierende Wirkung des Penicillamins auf Proteine könnte ebenfalls viele unerwünschte und gefährliche Reaktionen bewirken. Die Depolymerisation ribosomaler Proteine würde zu einem Stillstand der Proteinsynthese führen, während die Depolymerisation von Proteinenzymen zum Abbruch enzymatisch gesteuerter Reaktionen führen würde.

Diese möglichen Effekte, wie Zerfall der Ribosomen in ihre Subunits, Abbruch der Proteinsynthese und Hemmung der mRNA-Synthese könnten unter Umständen Veränderungen im Polysomenprofil der behandelten Embryonen bewirken.
Es wurden daher Versuche mit Penicillamin

durchgeführt, die diese Hypothese verifizieren oder widerlegen sollten.

12.3 Einfluß von D-Penicillamin auf die Polysomenprofile behandelter Rattenembryonen

In den Tagen 11, 12 und 13 der Trächtigkeit wurden Ratten jeweils um 10^{00} und 22^{00} Uhr 125 mg/kg D-Penicillamin intraperitoneal appliziert. Das Penicillamin war in der Konzentration von 50 mg/ml in 0,2 m Tris-HCl Puffer vom pH 7,2 gelöst. Zusätzlich erhielten die Tiere um die gleiche Zeit subkutan 0,2 ml/200 g Körpergewicht Sörensenpuffer (pH 7,4) appliziert. Eine Kontrollgruppe erhielt unter den gleichen Bedingungen und zu den gleichen Zeiten 1 ml/200 g 0,2 m Tris-HCl Puffer intraperitoneal und 0,2 ml/200 g Sörensenpuffer subkutan appliziert. Um festzustellen, ob aufgrund der oben beschriebenen Thiazolidinring-Bildung mit Pyridoxal die Penicillamin-Wirkung aufhebbar ist, wurden einer dritten Tiergruppe zusätzlich zur oben erwähnten Penicillamin-Behandlung noch um 10^{00} Uhr 80 mg/kg Vitamin B_6, gelöst in 1 ml Sörensenpuffer (pH 7,4), subkutan appliziert.

Einer vierten Gruppe wurden täglich um 10^{00} Uhr 80 mg/kg Vitamin B_6, in 1 ml Sörensenpuffer (pH 7,4) gelöst, subkutan

und 1 ml/2oo g o,2 m Tris-HCl Lösung (pH 7,2) intraperitoneal appliziert. Die Behandlung erstreckte sich bei allen vier Gruppen über drei Tage.

Am Tag 14 der Gestation wurden die Ratten getötet und embryonale Polysomen isoliert.
Die erstellten Polysomenprofile aus den Rattenembryonen der vier Gruppen wurden mit Hilfe des Computers quantitativ analysiert und die Flächen der korrespondierenden Peaks aus den Gruppen miteinander verglichen.
Entgegen unseren Erwartungen konnten keine signifikanten Veränderungen infolge der Penicillaminwirkung im Polysomenprofil beobachtet werden (siehe Tabelle 16 und Abbildung 19).
Es läßt sich zur Zeit noch nicht eindeutig sagen, ob dies auf eine vielleicht zu niedrige Dosierung oder aber auf im Polysomenprofil nicht sichtbar werdende Effekte zurückzuführen ist.

RE_{14}-Ko	RE_{14}-Pe	Δ [%]	RE_{14}-M	Δ [%]	RE_{14}-B_6	Δ [%]
1,4	1,6	+ 14 %	1,3	- 7 %	1,3	- 7 %
1,4	1,6	+ 14 %	2,1	+ 4o %	1,9	+ 36 %
12,8	8,3	- 35 %	12,4	- 3 %	15,1	+ 18 %
3,6	4,3	+ 19 %	3,o	- 17 %	4,o	+ 11 %
2o,3	2o,8	+ 2 %	15,1	- 26 %	16,o	- 21 %
6,1	6,8	+ 11 %	6,5	+ 7 %	7,9	+ 3o %
8,4	7,1	- 15 %	8,2	- 2 %	7,3	- 13 %
6,7	6,6	- 1 %	5,4	- 19 %	5,5	- 18 %
5,3	5,4	+ 2 %	5,8	+ 9 %	5,o	- 6 %
4,7	4,2	- 11 %	5,4	+ 15 %	4,3	- 9 %
3,3	3,3	± o %	4,o	+ 21 %	3,3	± o %

Tabelle 16

Einfluß von D-Penicillamin von Rattenembryonen am Tag 14 der Gestation.

Angegeben werden die Flächen der einzelnen korrespondierenden Peaks als Prozentangaben der Flächen der Profile, ferner Flächendifferenzen zwischen Versuchs- und Kontrollpeaks in Prozent der Kontrollwerte (Δ %). RE_{14}-Ko bedeutet Rattenembryo am Tag 14 der Gestation als unbehandelte Kontrolle, RE_{14}-Pe steht für mit D-Penicillamin behandelte Embryonen, RE_{14}-B_6 für mit Vitamin B_6 behandelte Embryonen und RE_{14}-M für mit D-Penicillamin und Vitamin B_6 behandelte Embryonen.

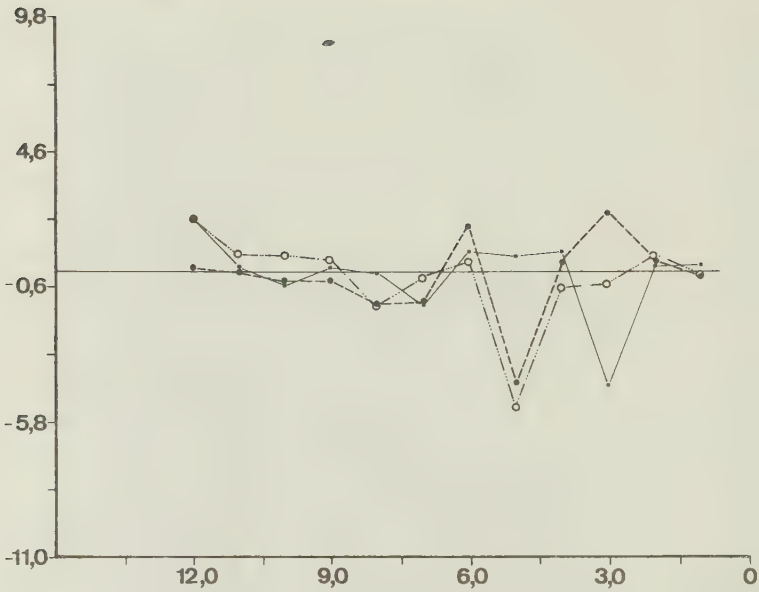


Abbildung 19

Graphische Darstellung der Computerauswertung der Polysomenprofile von Rattenembryonen am Tag 14 der Gestation nach dreitägiger Behandlung mit 250 mg/kg/Tag D-Penicillamin (●- - -●), bzw. 250 mg/kg/Tag D-Penicillamin plus 80 mg/kg/Tag Vitamin B6 (○·—·—○), bzw. nur 80 mg/kg/Tag Vitamin B6 (●————●) im Vergleich zu den Profilen der Kontrolltiere (Bezugswert = Nullinie).

Auf der Abszisse sind die Positionen der Aggregate von rechts nach links aufgetragen. Auf der Ordinate sind die Flächendifferenzen zwischen den Versuchs- und Kontrollwerten aufgetragen (in Prozent der Gesamtfläche unter jedem Profil).

V. Zusammenfassung

1. Es wurde eine Methode zur Erstellung reproduzierbarer und gut aufgelöster Polysomenprofile aus embryonalem und Lebergewebe entwickelt.

2. Ein Computerprogramm wurde zur quantitativen Auswertung von Polysomenprofilen herangezogen.
   Damit ist erstmals die Möglichkeit gegeben, die Mengenveränderungen jedes einzelnen polysomalen Aggregates infolge pharmakologischer Experimente quantitativ zu erfassen und zu bestimmen.

3. Die Untersuchung des Einflusses von tRNA als "RNAse-Inhibitor" auf die Polysomenprofile von Mäuse- und Rattenleber und Mäuseembryonen ergab, daß die Qualität der Rattenleberprofile im Gegensatz zu den Profilen aus Mäuseleber und -embryonen stark von der Zugabe von tRNA abhängt.

4. Die Polysomenprofile von Rattenembryonen in den Tagen 12, 13, 14 und 15 der Gestation wurden miteinander verglichen.
   Es wurde festgestellt, daß am Tag 12 der Gehalt der Embryozellen an schwereren Polysomen um rund 3o % bis 6o % größer

als in den anderen untersuchten Entwicklungstagen ist.

5. Die Polysomenprofile von Mäuseembryonen in den Tagen 11, 12 und 13 der Gestation wurden miteinander verglichen. Am Tag 11 war die Menge der schwereren Polysomen um rund 3o % bis 4o % größer als an den anderen Entwicklungstagen, während die Monosomenmenge um rund 4o % geringer war.

6. Der Vergleich der Polysomenprofile von Ratten- und Mäuseembryonen analoger Entwicklungsstadien zeigte, daß die Rattenembryonen 3o % bis 5o % weniger Mono- und Disomen als die entsprechenden Mäuseembryonen besaßen und 4o % bis 6o % mehr schwerere Polysomen.

7. Der Vergleich der Polysomenprofile aus Mäuseembryonen der Entwicklungstage 11, 12 und 13 mit den Profilen der zugehörigen mütterlichen Lebern zeigte, daß in den Lebern durchschnittlich 5o % bis 6o % weniger Mono- und Disomen und 3o % bis 4o % mehr schwerere Polysomen vorhanden waren.

8. Untersuchungen von Polysomenprofilen aus Lebern partiell hepatektomierter Ratten zeigten, daß die Menge der

schweren Polysomen 24 Stunden nach dem Eingriff im Vergleich zur Kontrolle massiv abnahm. Nach 48 Stunden war ein rückläufiger Trend zu beobachten, und nach 72 Stunden entsprach das Polysomenprofil wieder dem der unbehandelten Kontrolltiere.

9. Untersuchungen mit dem teratogenen Cytostatikum 6-Mercaptopurin (6-MP) zeigten, daß die Applikation von 5o mg/kg 6-MP an trächtigen Ratten am Tag 12 der Gestation nach 3 bzw. 6 Stunden massive Veränderungen im Polysomenprofil, und zwar Akkumulation schwerster Aggregate, bewirkte.
Diese Veränderungen im embryonalen Profil lassen sich auf die hemmende Wirkung des 6-MP auf die Purin- und Nukleinsäuresynthese zurückführen.
Es konnte also gezeigt werden, daß eine teratogene Substanz Veränderungen im Polysomenprofil behandelter Embryonen bewirkt, und daß daher die Erstellung und Auswertung von Polysomenprofilen eine geeignete Methode für molekularbiologische Untersuchungen darstellt.

1o. Untersuchungen mit dem teratogenen Cytostatikum Endoxan (Cyclophosphamid) zeigten, daß die Applikation von 1o mg/kg an Ratten am Tag 12 der Trächtigkeit

nach 1,5 Stunden keine Veränderungen im Polysomenprofil der Embryonen verursacht, daß jedoch nach 3 Stunden eine Zunahme der Monosomen um 28o % im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten war.
Am Tag 14 der Gestation hingegen war keine Veränderung im Profil zu beobachten.

11. Die Applikation von 25o mg/kg pro Tag des Aminosäureanalogs Penicillamin in den Tagen 11, 12 und 13 der Gestation an trächtigen Ratten bewirkte keine signifikanten Veränderungen im Polysomenprofil der behandelten Embryonen.

LITERATURVERZEICHNIS

ABRAHAM E.P.; CHAIN E.B.; BAKER W.; ROBINSON R.:
in: Nature 151, 1o7 (1943)

ARNSTEIN H.R.V.: The Action of Ribonuclease on the Microsomal Particles of Reticulocytes
in: The Biochem. J. 81, 24 (1961)

ARNSTEIN H.R.V: in: Rep. Progr. Chem. 6o, 512 (1963)

ASCIONE R.; ARLINGHAUS R.P.: Characterization and Cell-Free Activity of Polyribosomes Isolated from Baby Hamster Kidney Cells
in: BBA 2o4, 478 (197o)

ATTARDI G.; OJALA D.: Mitochondrial Ribosomes in HeLa Cells
in: Nature New Biol. 229, 133 (1971)

BAGLIONI C.; BLEIBERY I.; ZAUDERER M.; Assembly of Membrane-Bound Polyribosomes
in: Nature New Biol. 232, 8 (1971)

BENEDETTI E.L.; BONT W.S.; BLOEMENDAL H.:
in: Lab. Invest. 15, 196 (1966)

BLOBEL G.; POTTER V.R.: Relation of Ribonuclease and Ribonuclease Activity to the Isolation of Polysomes from Rat Liver
in: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 55, 1283 (1966)

BLOBEL G.; POTTER V.R.: Studies on Free and Membrane-Bound Ribosomes in Rat Liver
in: J. Mol. Biol. 26, 279 (1967)

BOESEN E.; DAVIS W.: in: Cytotoxic Drugs in the Treatment of Cancer (Arnold, London 1969)

BREGA A.; VESCO C.: Ribonucleoprotein Particles Involved in HeLa Mitochondrial Protein Synthesis
in: Nature New Biol. 229, 136 (1971)

BRITTEN R.J.; ROBERTS R.B.: Genetic and Environmental Control of Flowering in Trifolium Repens in the Tropics
in: Science N.Y. 131, 32 (196o)

BROOKES P.; LAWLEY P.D.: Alkylating Agents
in: Brit. Med. Bull. 2o, 91 (1964)

BUCHNER N.L.R.: Regeneration of Mamalian Liver
in: Int. Rev. Cytol. 15, 245 (1963)

CHAUBE S.; KURY G.; MURPHY M.L.: Teratogenic Effects of Tumor-Inhibiting Chemicals in the Rat
in: Cancer Chemoter. Rep. 51, 1222 (1967)

CLARK H.T.; JOHNSON J.R.; ROBINSON R.:
in: The Chemistry of Penicillin, Princeton 455 - 458 (1949)

CONGIN L.; CORONGIN F.P.; DESSI S.; SANNA A.:
in: Riv. Farm. Ter. 3, 243 (1972)

CONNORS T.A.; COX P.J.; FARMER P.B.; FOSTER A.B.; JARNAN M.: Some Studies of the Active Intermediates Formed in the Microsomal Metabolism of Cyclophosphamid and Isophosphamid
in: Biochem. Pharmacol. 23, 115 (1974)

DAS H.K.; GOLDSTEIN A.: Limited Capacity for Protein Synthesis at Zero Degrees Centigrade in E.Coli
in: J. Mol. Biol. 31, 2o9 (1968)

DE DUVE C.; BERTHET J.; BEAUFAY H.:
in: Progress in Biophysical Chemistry (Pergamon Press London, N.Y., Paris, L.A.) Vol. 9 (1959)

DELPINO A.; FERRINI U.: On the Functional State of Rat Liver Ribosomes following the Administration of the Carcinogene Dimethylnitrosamine
in: Eur. J. Cancer 9, 245 (1973)

DOWBEN R.M.; GAFFEY T.A.; LYNCH P.M.:
Isolation of Liver and Muscle Polyribosomes in High Yield After Cell Disruption by Nitrogen Cavitation
in: FEBS Letters 2, 1 (1968)

EARL D.C.N.; KORNER A.: The Isolation and Properties of Cardiac Ribosomes and Polysomes
in: Biochem. J. 94, 721 (1965)

ELION G.B.; BURGI E.; HITCHINGS G.H.: Studies on Condensed Pyrimidine Systems. IX. The Synthesis of Some 6-Substituted Purines.
in: J. Amer. Chem. Soc. 74, 411 (1952)

FLORINI J.R.; BREUER C.B.: Amino Acid Incorporation into Protein by Cell-Free Systems from Rat Skeletal Muscle. V. Effects of Pituarity Growth Hormone on Activity of Ribosomes and Ribonucleic Acid Polymerase in Hypophysectomized Rats
in: Biochemistry 5, 1870 (1966)

FRIEDMAN H.; LU P.; RICH A.: Ribosomal Subunits Produced by Cold Sensitive Initiation of Protein Synthesis
in: Nature 223, 909 (1969)

FULLER W.; HODGSON A.: Conformation of the Anticodon Loop in tRNA
in: Nature 215, 817 (1967)

GEHATIA M.; KATCHALSKI E.: Brownian Motion in the Centrifugal Field
in: J. Chem. Phys. 30, 1334 (1959)

GERLINGER M.A.; LE MEUR J.; EBEL J.P.:
Comparative Methods for Isolation of Polysomes from the Oviduct of Laying Hen
in: Biochemie 55, 297 (1973)

GIERER P.: Function of Aggregated Reticulocyte Ribosomes in Protein Synthesis
in: J. Mol. Biol. 6, 148 (1963)

HARDESTY B.; HUTTON J.J.; ARLINGHAUS R.; SCHWEET R.:
Polyribosom Formation and Hemoglobulin Synthesis
in: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 5o, 1o78 (1963)

HASENBANK G.; KÖRBER F.; SIEGMUND P.:
Über die Reaktionen von D- und L-Penicillamin mit Alanintransaminase und mit einigen Aldiminen des Pyridoxalphosphats
in: Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 349, 31o (1968)

HUANG A.S.; BALTIMORE D.: Initiation of Polyribosome Formation in Poliovirus-Infected HeLa Cells
in: J. Mol. Biol. 47, 275 (1969)

HUEZ G.; BURNY A.; MARBAIX G.; LEBLEU B.:
Release of Messenger RNA from Rabbit Reticulocyte Polyribosomes at Low Concentration on Divalent Cations
in: BBA 145, 629 (1967)

HUNTER A.R.; KORNER A.: A Comparison of Triton and Deoxycholate in the Preparation of Ribonucleoprotein Particles
in: Biochem. J. 1oo, 73 (1968)

KALTSCHMIDT E.; WITTMANN H.G.: Ribosomal Proteins XII. Number of Proteins in Small and Large Ribosomal Subunits of E. Coli as Determined by Two-Dimensional Gel Electrophoresis
in: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 67, 1276 (197o)

KALTSCHMIDT E.; WITTMANN H.G.: Ribosomal Proteins VII. Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis for Fingerprinting of Ribosomal Proteins
in: Anal. Biochem. 36, 4o1 (197o)

KAMATH S.A.; KUMMEROW F.A.: A Simple Procedure for the Isolation of Rat Liver Microsomes
in: FEBS Letters 17, 9o (1971)

KÖHLER E.; MERKER H.J.; EHMKE W.; WOJNOROWICZ F.: Growth Kinetics of Mamalian Embryos During the Stage of Differentiation
in: Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 272, 169 (1972)

KREYBIG von Th.: Die teratogene Wirkung von Cyclophosphamid während der embryonalen Entwicklung der Ratte in: Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 252, 173 (1965)

KREYBIG von Th.: Zur chemischen Teratogenese bei der Ratte in: Arzneimittelforschung 16, 989 (1966)

KUCHINSKAS E.J.; ROSEN Y.: Metall Chelates of D, L-Penicillamine in: Arch. Biochem. Biophys. 97, 37o (1962)

KÜNTZEL H. ; NOLL H.: Mitochondrial and Cytoplasmic Polysomes from Neurospora Crossa in: Nature 215, 134o (1967)

KURY G.; CHAUBE S.; MURPHY M.L.: Teratogenic Effects of Some Purine Analogues on Fetal Rats in: Arch. Path. 86, 395 (1968)

LAMFROM H.; KNOPF P.M.: Properties of Reticulocyte 8o S Ribosomes in: J. Mol. Biol. 11, 589 (1965)

LA VIA M.R.; VATTER A.E.; HAMMOND W.S.; NORTHRUP P.V.: The Nature of Polysomes Isolated from Spleen Cells of Rats Stimulated by Antigen in: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 57, 79 (1967)

LAWFORD G.R.; LANGFORD P.; SCHACHTER H.:
in: J. Biol. Chem. 241, 1853 (1966)

LITTLEFIELD J.W.; KELLER E.B.; GROSS J.;
ZAMECNIK P.C.: Studies on Cytoplasmic Ribonucleoprotein Particles from the Liver of the Rat
in: J. Biol. Chem. 217, 111 (1955)

MANNER G.; GOULD B.S.: Ribosomal Aggregates in Gamma-Globulin Synthesis in the Rat
in: Nature 205, 670 (1965)

MARKS P.A.; BURKA E.R.; CONCONI F.R.; PERL W.;
RIFKIND R.A.: Polyribosome Dissociation and Formation in Intact Reticulocytes with Conservation of mRNA
in: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 53, 1437 (1965)

MC CARTY K.S.; STAFFORD D.; BROWN O.:
Resolution and Fractionation of Macromolecules by Isokinetic Sucrose Density Gradient Sedimentation
in: Anal. Biochem. 24, 314 (1968)

MUNRO A.J.; JACKSON R.J.; KORNER A.:
Studies on the Nature of Polysomes
in Biochem. J. 92, 289 (1964)

MURPHY M.L.: in: Ciba Foundation Symposium on Congenital Malformations, 78 (1960)

MURTHY M.R.V.; RAPPOPORT D.A.:
Biochemistry of the Developing Rat Brain VI. Preparation and Properties of Ribosomes
in: BBA 95, 132 (1965)

NAIR K.G.; ZAK R.; RABINOVITZ M.:
Studies on the Effect of Proteolytic Enzymes on Ribosomes and Polysomes from Reticulocytes and Rat Liver
in: Biochemistry 5, 2674 (1966)

NIMNI M.E.; BAVETTA L.A.: Collagen Deffect Induced by Penicillamine in
Science 15o, 9o5 (1965)

NOLL H.; STAEHELIN T.; WETTSTEIN F.:
Ribosomal Aggregates Engaged in Protein Synthesis: Ergosome Breakdown and mRNA Transport
in: Nature 198, 632 (1963)

NOLL H.: Characterization of Macromolecules by Constant Velocity Sedimentation
in: Nature 215, 36o (1967)

NOLL H.: Automatic High-Resolution Gradient Analyzing System
in: Anal. Biochem. 27, 13o (1969)

NOLL H.: Konstruktion und Wirkungsweise neuer Instrumente zur Erzielung höchster Auflösung bei der Sedimentationsanalyse in Dichtegradienten

und ihre Anwendung zum Studium der Struktur von Ribosomen
in: Vierteljahresschrift der naturforschenden Gesellschaft in Zürich 3, 377 (1971)

O'BRIEN T.W.; KALF G.F.: Ribosomes from Rat Liver Mitochondria I. Isolation Procedure and Contamination Studies
in: J. Biol. Chem.

OHTSUBO K.; KADEN P.; MITTERMAYER C.: Polyribosomal Breakdown in Mouse Fibroblasts (L-Cells) by Fusarenon-X, a Toxic Principle isolated from Fusarium Nivale
in: BBA 207, 52o (1972)

OLSNES S.: Characterization of Protein Bound to Rapidly Labelled RNA in Polyribosomes from Rat Liver
in: Eur. J. Biochem. 15, 464 (197o)

OLSNES S.: The Isolation of Polyribosomes from Rat Liver; Contamination by Membrane Proteins with High Affinity to Ribosomes
in: BBA 232, 7o5 (1971)

PALADE G.E.: A Small Particulate Component of the Cytoplasm
in: J. Biophys. Biochem. Cytol. 1, 59 (1955)

PALADE G.E.; SIEKEVITZ P.:
in: J. Biophys. Biochem. Cytol. 2, 171 (1956)

PAUL D.; LEFFERT H.; SATO G.; HOLLEY R.W.:
Stimulation of DNA and Protein Synthesis in Fetal Rat Liver Cells by Serum from Partially Hepatectomized Rats
in: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 374 (1972)

PERRY R.P.; KELLY D.E.: Messenger RNA-Protein Complexes and Newly Synthesized Ribosomal Subunits: Analysis of Free Particles and Components of Polyribosomes
in: J.Mol. Biol. 35, 37 (1968)

PETERMAN M.L.: The Physical and Chemical Properties of the Ribosom
(Elsevier Publ. Comp. Amsterdam 1964)

PFUDERER P.; COMMARANO P.; HOLLADAY D.R.; NOVELLI G.D.: A Helical Polysome Model
in: BBA 109, 595 (1965)

PIATIGORSKY J.: Ribonuclease and Trypsin Treatment of Ribosomes and Polyribosomes from Sea Urchin Eggs
in: BBA 166, 142 (1968)

RAGNOTTI G.: Effect of a Modified Separation Procedure on the Size and Protein-Synthetic Activity of Membrane-Bound Liver Polyribosomes
in: Biochem. J. 125, 1o49 (1971)

RICH A.; WARNER J.; GOODMAN H.M.:
in: Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol. 28, 269 (1963)

RIFKIN M.R.; WOOD D.D.; LUCK D.J.L.: Ribosomal RNA and Ribosomes from Mitochondria from Neurospora Crassa
in: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 58, 1o25 (1967)

ROBINSON E.; BROWN R.: Cytoplasmic Particles in Bean Root Cells
in: Nature 171, 313 (1953)

ROTH J.S.: Ribonuclease. VII. Partial Purification and Characterization of a Ribonuclease Inhibitor in Rat Liver Supernatant Fraction
in: J. Biol. Chem. 23, 1o85 (1958)

ROWLEY P.T.; MORRIS J.: Enhanced Polyribosome Recovery from Reticulocytes using Heparin
in: Exp. Cell Res. 45, 494 (1966)

SCHNEIDER W.: Die Wirkung von Penicillamin auf pathologische Makroglobuline
in: Münchener Med. Wochenzeitschr. 1o, 531 (1967)

SCHREIER M.H.; STAEHELIN T.: Initiation of Mamalian Protein Synthesis: The Importance of Ribosome and Initiation Factor Quality for the Efficiency of in-vitro Systems in: J. Mol. Biol. 73, 329 (1973)

SCHUMAKER V.N.: Zone Centrifugation in: Adv. Biol. Med. Phys. 11, 245 (1967)

SLAYTER H.S.; WARNER J.R.; RICH A.; HALL C.E.: in: J. Mol. Biol. 7, 652 (1963)

SPOHR G.; GRANBOULANT N.; MOREL C.; SCHERRER K.: Messenger RNA in HeLa Cells in: Eur. J. Biochem. 17, 296 (1970)

SPRAGG S.P.; RANKIN C.T.: The Capacity of Zones in Density-Gradient Centrifugation in: BBA 141, 164 (1967)

STAEHELIN T.; WETTSTEIN F.O.; OURA H.; NOLL H.: Determination of the Coding Ratio Based on Molecular Weight of mRNA Associated with Ergosomes of Different Aggregate Size in: Nature 201, 264 (1964)

SUGANO H.; WATANABE I.; OGATA K.: in: J. Biochem. Tokyo 61, 778 (1967)

SVEDBERG T; PEDERSEN K.O.:
The Ultracentrifuge
(Steinkopff, Dresden/Leipzig 1940)

TAKAHASHI Y.; MASE K.; SUGANO H.:
Preparation of Polysomes from
Rat Brain Tissue
in: BBA 119, 627 (1966)

TSUKADA K.: Activity of Serum Ribonuclease
After Partial Hepatectomie and
Acute Stress in the Rat
in: BBA 186, 21 (1969)

TUCHMANN-DUPLESSIS H.; MERCIER-PAROT L.:
Sur L'Action Abortive et
Teratogenic de la 6-Chloropurine
in: C. R. Soc. Biol. (Paris)
153, 1133 (1959)

VESCO C.; COLOMBO B.: Effect of Sodium
Fluoride on Protein Synthesis
in HeLa Cells: Inhibition of
Ribosome Dissociation
in: J. Mol. Biol. 47, 335 (1970)

VINOGRAD J.; BRUNNER R.: Band Centrifugation
of Macromolecules in Self-
Generating Density Gradients.
III. Conditions for Convection-
Free Band Sedimentation
in: Biopolymers 4, 157 (1966)

WARNER J.; RICH A.; HALL C.E.:
Electron Microscope Studies of Ribosome Clusters Synthesizing Hemoglobin
in: Science 138, 1399 (1962)

WATTS R.L.; MATHIAS A.R.: The Use of Bentonite in the Isolation of Polyribosomes
in: BBA 145, 828 (1967)

WETTSTEIN F.O.; STAEHELIN T.; NOLL H.:
Ribosomal Aggregates Engaged in Protein Synthesis: Characterization of the Ergosomes
in: Nature 197, 430 (1963)

WILLIAMSON A.R.; ASKONAS B.A.:
in: J. Med. Biol. 23, 201 (1967)

WILLIAMSON A.R.; LANYON G.; PAUL J.:
Preferential Degradation of mRNA in Reticulocytes by Ribonuclease Treatment and Sonification of Polysomes
in: Nature 223, 628 (1969)

YAMAGAMI S.; MORI K.: Changes in Polysomes of the Developing Rat Brain
in: J. Neurochem. 17, 721 (1970)

ZAK R.; NAIR K.G.; RABINOVITZ M.: Effect of Trypsin on E. Coli and Rabbit Reticulocyte Ribosomes
in: Nature 210, 169 (1966)

ZYBLER E.R.; PENMAN S.: The Disruption of
Polyribosomes by Sonification
in: BBA 204, 230 (1971)

ANHANG

Polysomenprofil aus Rattenembryonen am Tag 12 der Gestation in der dem CDC 7200-Computer eingegebenen unaufgelösten Form.

Dargestellt wird die aufgelöste Form des auf der gegenüberliegenden Seite abgebildeten Polysomenprofils, wie sie vom CDC 7200-Computer geliefert wird.

LAUFNUMMER= 103 ;

NPRO= 1 NKOEF= 3 K7=14 EPS= .50 EPSI= .50 XGRENZ=8.00 NFIT=15 NDAT=213 LUECKE= -50.0 BIS -49.4 LUECKE= 0.0 BIS .1

FRAKTION	SS	SD	SA	SE	BB	BD	BA	BE
1	.001	.050	-2.000	2.000	2.000	.100	1.000	3.000
2	-15.503	.100	-20.000	-10.000	2.500	.100	1.500	3.500
3	-28.001	.100	-33.000	-22.000	3.500	.100	2.500	4.500
4	-40.003	.100	-45.000	-35.000	4.000	.100	3.000	5.000
5	-50.003	.050	-55.000	-45.000	4.500	.100	3.500	5.500
6	-59.000	.100	-64.000	-54.000	5.000	.100	4.000	6.000
7	-68.003	.100	-73.000	-63.000	5.500	.100	4.500	6.500
8	-76.000	.100	-81.000	-71.000	6.000	.100	5.000	7.000
9	-84.000	.100	-89.000	-79.000	6.500	.100	5.500	7.500
10	-91.000	.100	-96.000	-86.000	7.000	.100	6.000	8.000
11	-97.000	.100	-100.000	-94.000	7.500	.100	6.500	8.500
12	14.503	.100	9.500	19.500	4.000	.100	3.000	5.000
13	6.500	.100	2.000	11.000	2.250	.100	1.250	3.250
14	-10.003	.100	-15.000	-5.000	2.750	.100	1.750	3.750

ITEPATION	CHI	C1	C2	C3	C4
1	14.604	-.490	.460	.200	0.000
2	5.028	-.490	.460	.200	0.000
3	3.331	-.490	.460	.200	0.000
4	2.952	-.490	.460	.200	0.000
5	2.769	-.490	.460	.200	0.000
6	2.695	-.490	.460	.200	0.000
7	2.594	-.489	.461	.215	0.000
8	2.536	-.492	.461	.220	0.000
9	2.485	-.492	.461	.230	0.000
10	2.442	-.492	.462	.240	0.000
11	2.403	-.492	.462	.250	0.000
12	2.368	-.492	.462	.260	0.000
13	2.335	-.492	.463	.270	0.000
14	2.307	-.493	.463	.280	0.000
15	2.280	-.492	.463	.290	0.000
16	2.254	-.492	.463	.300	0.000
17	2.233	-.491	.464	.310	0.000
18	2.209	-.492	.464	.315	0.000
19	2.186	-.493	.464	.320	0.000
20	2.173	-.494	.464	.324	0.000

FRAKTION	FK	BK	SK	FLAECHE	FEHLER	BREITE	STELLE
1	6.497	2.015	.203	7.616	.018	1.000	0.000
2	4.799	2.779	-15.380	5.157	.030	1.378	-15.465
3	6.561	4.458	-28.267	7.692	.044	2.716	-28.254
4	8.763	4.266	-40.043	10.274	.037	2.116	-39.941
5	9.975	4.131	-50.179	11.692	.036	2.049	-50.000
6	9.861	4.311	-59.400	11.560	.043	2.133	-59.151
7	9.731	4.367	-68.024	11.430	.053	2.454	-67.709
8	10.225	4.417	-76.356	11.482	.099	2.934	-75.978
9	9.706	4.577	-83.584	3.456	.175	3.260	-87.548
10	9.809	4.814	-90.996	6.292	.292	3.380	-90.507
11	10.643	7.462	-96.809	2.425	.383	3.672	-96.776
12	.540	3.977	15.693	.639	.062	1.972	15.372
13	.7	1.715	7.389	.931	.045	1.386	6.831
14	1.11	3.717	-9.389	1.382	.050	1.844	-9.222

Protokoll der Computerauswertung des umseitigen aufgelösten Polysomenprofils. CHI ist ein Maß für die Genauigkeit der Auswertung (kleines CHI = große Genauigkeit), c1, c2 und c3 sind die Profilparameter, BK = Halbwertsbreite der Funktion, FK = Integrationskonstante, Fläche = Fläche unter den einzelnen Peaks, Fehler = Standardabweichung bzw. methodischer Fehler

Izhak Dornacher
1 Berlin 33
Hagenstr. 79

L E B E N S L A U F

Geburtsdatum:	3o. März 1944
Geburtsort:	Tel-Aviv/Israel
Vater:	Alfred Dornacher (Ingenieur)
Mutter:	Frieda Dornacher, geb. Wielcosz
Sept. 195o - Juli 1958:	Besuch der Volksschule in Tel-Aviv/Israel
Sept. 1958 - Juli 1959:	Besuch des städtischen Gymnasiums in Tel-Aviv/Israel
Nov. 1959 - Febr. 1964:	Besuch des Liebig-Gymnasiums in Frankfurt/M
Febr. 1964:	Abitur
SS 1964:	Chemie-Studium an der Liebig Universität in Giessen
WS 1964/65 - WS 1966/67:	Chemie-Studium an der Goethe Universität in Frankfurt/M
Febr. 1967:	Vordiplom-Examen
SS 1967 - WS 1968/69:	Chemie-Studium an der FU Berlin
SS 1969 - WS 1969/7o:	Chemie-Studium an der Gutenberg Universität in Mainz
Juli 197o:	Diplom-Examen an der FU Berlin
Juli 197o - März 1971:	Diplomand am Institut für organische Chemie der FU Berlin
März 1971 - Nov. 1971:	Doktorand am Institut für organische Chemie der FU Berlin
Seit Nov. 1971:	Doktorand am Institut für Pharmakologie der FU Berlin (Abt. Embryonalpharmakologie, Sonderforschungsbereich 29)